# INITIATION UND REGULATION DER VITELLOGENIN-SYNTHESE BEI DER BIENENKÖNIGIN (APIS MELLIFICA L.)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

**Hans-Hinrich Kaatz**
aus Hamburg

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546523_0008

# INITIATION UND REGULATION DER VITELLOGENIN-SYNTHESE BEI DER BIENENKÖNIGIN (APIS MELLIFICA L.)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

**Hans-Hinrich Kaatz**

aus Hamburg

1985

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 15. August 1985 |
| Dekan: | Prof. Dr. H.U. Seitz |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. W. Engels |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. D. Ammermann |

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrbereich Entwicklungsphysiologie der Universität Tübingen angefertigt. Herrn Prof. Dr. W. Engels danke ich für die vertrauensvolle Überlassung von Thema und Arbeitsplatz, seine engagierte Förderung meiner Arbeiten in den USA und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. H. H. Hagedorn (Cornell University), der nicht nur durch seine stetige konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft an der Gestaltung der Arbeit beteiligt war, sondern mich auch in die in vitro-Kultur-Techniken und die amerikanische Kultur und Lebensweise einführte und mir oft moralisch eine wichtige Stütze war. In Erinnerung an die Kopf und Hand auf- und anregende Zeit in Ithaca einen herzlichen Dank an Drs. Sharon Greenberg, Bob Gemill, Pete Masler, Jeff Shapiro, Jeff Wheelock und Bob Glaser sowie Prof. Dr. Roger Morse und seine "Dyce Brothers".

Ich möchte mich ganz besonders bei Ditte Siemesgelüss für ihre hervorragende Zusammenarbeit bei vielen Versuchen, vor allem beim Baden der Bienen bedanken.

Auch danke ich Regina Braun, Sąbine Reimann und Anne Zillikens, die das Manuskript durchsahen und wertvolle Anregungen gaben, wie auch allen Mitarbeitern in Tübingen, die für wohlige Nestwärme sorgten. Insbesondere möchte ich unsere Imker erwähnen, die sich bemühten, bis in die Weihnachtszeit hinein Königinnen aufzuziehen, allen voran die Imkermeister Geert Staemmler und Franz Hertl. Ferner danke ich Eberhard Daerr für die Einführung in die Mysterien der Allatektomie, Catherine Messer für die Eingabe des Textes in unseren Laborcomputer und dem Nachtwächter für manch aufmunternden Klöhnschnack.

Dem DAAD und der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|---|---|
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CA | Corpus allatum, Corpora allata |
| CC | Corpus cardiacum, Corpora cardiaca |
| cpm | counts per minute |
| dpm | disintegrations per minute, Zerfälle pro Minute |
| EDNH | Eientwicklungs-Neurosekretorisches Hormon |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetraacetat |
| GC | Gaschromatographie |
| GU | Galleria-Einheit |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| IgG | Immunglobulin G |
| JH | Juvenilhormon |
| K | Kilodalton |
| kb | Kilobasen |
| KBK | Kirchhainer Begattungskästchen |
| $K_D$ | Dissoziationskonstante |
| LSC | Flüssigkeitsszintillationszähler |
| M | Molarität |
| MS | Massenspektrometrie |
| MW | Molekulargewicht |
| NET | Natriumchlorid-EDTA-Tris |
| NP40 | Nonidet P 40 (Detergens) |
| NSC, NSZ | Neurosekretorische Zellen des Gehirns |
| PAGE | Polyacrylamidgel-Elektrophorese |
| PBS | Phosphat-Puffer (phosphate buffered saline) |
| PIPES | 1,4-Piperazindiethansulfonsäure |
| PMSF | Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid |
| PTTH | Prothorakotropes Hormon |
| PTU | Phenylthioharnstoff |
| RIA | Radioimmunoassay |
| s | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TLC | Dünnschichtchromatographie |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| VG | Vitellogenin |
| YP | Dotterprotein (yolk polypeptide) |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

Inhaltsverzeichnis


| | | |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | |
| 1. | Vitellogenin | 1 |
| 2. | Endocrine Regulation der Dotterbildung bei Insekten | 2 |
| 3. | Der imaginale Fettkörper: Metamorphose als Differenzierungs-Modell | 5 |
| 4. | Vitellogenin bei Honigbienen | 8 |
| 5. | Arbeitsprogramm | 13 |
| II. | MATERIAL UND METHODEN | |
| 1. | Versuchstiere | 15 |
| 1.1. | Königinnen | 15 |
| 1.2. | Arbeiterinnen und Drohnen | 15 |
| 2. | Material | 16 |
| 2.1. | Chemikalien | 16 |
| 2.2. | Pufferlösungen, Färbelösungen | 16 |
| 2.2.1. | Pufferlösungen | 16 |
| 2.2.2. | Färbelösungen | 19 |
| 3. | Methoden | 19 |
| 3.1. | Bestimmung und Charakterisierung von Entwicklungsstadien der Bienenkönigin | 19 |
| 3.2. | Präparationsverfahren in vivo | 20 |
| 3.2.1. | Hämolymph-Gewinnung | 20 |
| 3.2.2. | Homogenisierung von Ovarien | 20 |
| 3.3. | Operationsverfahren in vivo | 21 |
| 3.3.1. | Dekapitation von Königinnen-Puppen | 21 |
| 3.3.2. | Inkubation dekapitierter Königinnen-Puppen | 21 |
| 3.3.3. | Allatektomie | 22 |
| 3.4. | Bestimmung des Volumens der Corpora allata | 24 |
| 3.5. | Hormonbestimmungen | 25 |
| 3.5.1. | Juvenilhormon-Titer-Bestimmung | 25 |
| 3.5.2. | Bestimmung der Juvenilhormon-Biosyntheseaktivität der Corpora allata von Bienenköniginnen | 31 |
| 3.5.3. | Bestimmung des Ecdysteroid-Titers der Hämolymphe | 32 |
| 3.6. | Proteinbestimmungen | 35 |
| 3.6.1. | Quantitative Proteinbestimmung | 35 |
| 3.6.2. | Hämolymphproteinmuster | 35 |
| 3.7. | Immuntechniken | 37 |
| 3.7.1. | Herstellung eines Vitellogenin-spezifischen Antikörpers | 37 |
| 3.7.2. | Äquivalenzpunktbestimmung von Vitellogenin und Anti-Vitellogenin-Serum durch quantitative Präzipitation | 39 |
| 3.7.3. | Zweidimensionale Immunelektrophorese | 40 |
| 3.7.4. | Radiale Immundiffusion | 41 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.8. | Proteinsynthese-Bestimmungen in vivo | 42 |
| 3.8.1. | Quantitative Bestimmung der Synthese aller Hämolymphproteine | |
| 3.8.2. | Quantitative Bestimmung der Vitellogenin-Synthese via indirekter Immunopräzipitation mit Protein A | 46 |
| 3.8.3. | Bestimmung der Synthese einzelner Proteine via Fluorographie | 52 |
| 3.9. | Methoden der in vitro-Kultur von Organen der Honigbiene | 54 |
| 3.9.1. | Zusammensetzung des Kulturmediums | 54 |
| 3.9.2. | Medienherstellung | 56 |
| 3.9.3. | Weitere verwendete Kulturmedien | 56 |
| 3.9.4. | Präparationsverfahren | 56 |
| 3.9.5. | Organkultur | 57 |
| 3.9.6. | Bestimmung von Protein- und Vitellogenin-Synthese in vitro | 58 |
| 3.9.7. | Inkubation der Organe mit Juvenilhormon, Ecdysteron, Hämolymphe und Kopfextrakten | 59 |
| 3.10. | Allgemeines zu den Abbildungen | 59 |

III. ERGEBNISSE

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Bestimmung und Charakterisierung von Entwicklungsstadien in der Königinnen-Entwicklung | 60 |
| 1.1. | Entwicklungsdauer | 60 |
| 1.2. | Puppenentwicklung | 60 |
| 2. | Untersuchungen zum Endocrinum der Honigbiene | 62 |
| 2.1. | Juvenilhormon | 62 |
| 2.1.1. | Spezifische Aktivität des JH III im Galleria-Wachs-Test | 62 |
| 2.1.2. | Empfindlichkeit der Galleria-Puppen für JH III im Jahreszyklus | 63 |
| 2.1.3. | JH-Gehalt in der Hämolymphe von Königinnen | 64 |
| 2.1.4. | JH-Gehalt der Hämolymphe von frisch geschlüpften Drohnen und Arbeiterinnen | 64 |
| 2.1.5. | Die Juvenilhormon-Syntheseaktivität der Corpora allata von Bienenköniginnen | 66 |
| 2.1.6. | Corpora alata-Volumen von Königinnen-Puppen und jungen Imagines | 67 |
| 2.2. | Ecdysteroide | 68 |
| 2.2.1. | Ecdyson-Standard-Eichkurve | 68 |
| 2.2.2. | Bestimmung der Extraktionsausbeute für Ecdyson | 68 |
| 2.2.3. | Ecdysteroid-Titer | 69 |
| 3. | Identifizierung und Charakterisierung von Vitellogenin | 72 |
| 3.1. | Vitellogenin | 72 |
| 3.2. | Antiserum gegen Vitellogenin | 75 |
| 4. | Hämolymph-Protein- und Vitellogenin-Synthese bei Königinnen in vivo | 78 |
| 4.1. | Kinetik der Tracer-Inkorporation in Hämolymphproteine | 78 |
| 4.2. | Quantitative Synthese von Hämolymph-Proteinen und Vitellogenin im Verlauf der königlichen Ontogenese | 79 |
| 4.3. | Das Muster der Hämolymphproteine und ihre Synthese im Verlauf der Ontogenese von Königinnen | 83 |

| | | |
|---|---|---|
| 5. | Vergleich der Hämolymphprotein- und Vitellogeninsynthese bei Königinnen, Arbeiterinnen und Drohnen | 86 |
| 6. | Kontrolle der Initiation der Vitellogenin-Synthese | 87 |
| 6.1. | Allatektomie und Dekapitierung von Königinnenpuppen | 87 |
| 6.1.1. | Allatektomie | 87 |
| 6.1.2. | Dekapitierung | 90 |
| 6.2. | JH-Behandlung dekapitierter Königinnenpuppen | 93 |
| 6.3. | JH-Behandlung von Königinnenpuppen | 95 |
| 6.4. | JH-Gehalt der Hämolymphe dekapitierter und allatektomierter Königinnenpuppen | 96 |
| 7. | Allatektomie von Jungköniginnen | 98 |
| 8. | Entwicklung eines in vitro-Systems für Kurz- und Langzeitkultur von Organen der Honigbiene | 99 |
| 8.1. | Entwicklung der Kulturbedingungen in vitro | 99 |
| 8.1.1. | Fettkörper-Kultur von Arbeiterinnen in vitro | 99 |
| 8.1.2. | Adaptation des in vitro-Kultursystems für Fettkörper von Königinnen | 105 |
| 8.1.3. | Ovarkulturbedingungen | 106 |
| 8.2. | Experimente zur Optimierung des in vitro-Kulturmediums | 108 |
| 8.2.1. | pH-Wert | 108 |
| 8.2.2. | Osmolarität des in vitro-Kulturmediums | 109 |
| 8.2.3. | Vitamine und Phosphatgehalt | 109 |
| 8.2.4. | BSA und Ficoll | 110 |
| 8.2.5. | Puffersubstanzen | 111 |
| 9. | Proteinsynthese von Fettkörper und Ovar in vitro | 112 |
| 9.1. | Fettkörper | 112 |
| 9.2. | Ovarien | 115 |
| 10. | Beeinflussung von Protein- und Vitellogenin-Synthese des Fettkörpers durch verschiedene Faktoren | 118 |
| 10.1. | Juvenilhormon | 118 |
| 10.2. | Hämolymphe | 119 |
| 10.3. | Kopfextrakte | 122 |
| 10.4. | Ovarien | 122 |
| 10.5. | Ecdysteron | 124 |
| IV. | DISKUSSION | |
| 1. | Etablierung eines in vitro-Systems zur Kultur von Honigbienen-Organen | 125 |
| 2. | Identifizierung und Charakterisierung von Vitellogenin | 131 |
| 3. | Hormontiter in der Ontogenese der Bienenkönigin | 134 |
| 3.1. | Ecdysteroide | 134 |
| 3.2. | Juvenilhormon | 138 |
| 3.3. | JH-Biosynthese bei Bienenköniginnen | 141 |
| 3.4. | Volumen der Corpora allata | 143 |
| 4. | Initiation der Vitellogenin-Synthese und ihre Kontrolle | 144 |

5. Regulation der Vitellogenin-Synthese 151

V. ZUSAMMENFASSUNG 160

VI. LITERATUR 163

# I. Einleitung

## 1. Vitellogenin

Der auffälligste Vorgang der Oogenese ist das Riesenwachstum der Oocyte, das vor allem auf der Einlagerung von Speicherproteinen, den Dotterproteinen, beruht. Die Dotterproteine dienen dem Embryo später als Nahrungsquelle. Weit mehr als 50 % des Volumens ablagereifer Oocyten wird vom Dotter eingenommen, der in Form von Dotterschollen im Cytoplasma der Oocyte eingelagert wird.

Dotterproteine werden in der Regel außerhalb des Ovars synthetisiert: Bei Insekten im Fettkörper, bei Vertebraten in der Leber. Sie werden in die Hämolymphe bzw. das Blut sezerniert und von der Oocyte selektiv durch Pinocytose aufgenommen. Dotterproteine kommen vor allem bei Weibchen vor, deshalb sind sie auch als Weibchen-spezifische Proteine bezeichnet worden (TELFER, 1954). Er fand ein Weibchen-spezifisches Protein in den Eiern von Hyalophora in 20 - 30 fach höherer Konzentration als im Blut der Tiere (TELFER, 1960). Mit dem Nachweis immunologischer Identität zwischen Weibchen-spezifischem Protein und Dotterprotein wurde es folgerichtig als "Vitellogenin" bezeichnet (PAN et al., 1969). Nach der Aufnahme in die Oocyte, der Vitellogenese, wird es in den Dotterschollen als Dotterprotein oder Vitellin bezeichnet.

Umfangreiche Studien an vielen Insekten (vgl. HAGEDORN und KUNKEL, 1979; ENGELMANN, 1979) haben zur folgenden Definition von Insekten-Vitellogenin geführt:

1. Vitellogenin wird vom Fettkörper der Insekten synthetisiert (PAN et al., 1969; BROOKES, 1969).
2. Es wird vom Ovar selektiv aus der Hämolymphe aufgenommen (TELFER, 1960).
3. Vitellin stellt den Hauptanteil aller löslischer Proteine der Oocyte (BELL, 1970; HAGEDORN und JUDSON, 1972). Es ist nur in den Schollen vorhanden.
4. Das Vitellogenin kommt vor allem bei Weibchen vor (BELL, 1969a).

Neben Untersuchungen zu Regulationen und Funktionen der Vitellogenese ist in letzter Zeit das Vitellogenin-Molekül selber mit molekularbiologischen

Methoden näher untersucht worden. Aus der Vielzahl der Daten zu Vitellogenin und Vitellin (KUNKEL und NORDIN, 1984) lassen sich einige gemeinsame Eigenschaften ableiten: Vitellogenine sind Glycolipoproteine mit z.T. stark variierendem Kohlenhydrat-Anteil. In Einzelfällen sind im Molekül auch Phosphat-Anteile enthalten (ENGELMANN und FRIEDEL, 1974). Das native Molekül hat häufig ein Molekulargewicht von 500.000 d. Denaturierende Bedingungen der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese führen in den meisten Fällen zu zwei Untereinheiten unterschiedlicher Größe, einem höhermolekularen und einem niedermolekularen, das in jedem Fall ein Molekulargewicht von 50-70.000 d hatte. Diese Übereinstimmung hat zu der Vorstellung geführt, daß die Vitellogenine aller Insekten von einem ursprünglichen Molekül aus zwei Domänen, einer großen und einer kleinen, abstammen. Bei einigen Insektengruppen, u.a. bei höheren Dipteren, sei dann eine der beiden Komponenten verloren gegangen bzw. werde nicht mehr exprimiert (HARNISH und WHITE, 1982b). Allerdings fußt diese Hypothese nur auf Analysen der Molekulargewichte und Aminosäure-Zusammensetzung. Solange bisher nur die Dotterprotein-Gene von Drosophila vollständig sequenziert sind (HOVEMANN et al., 1981, HUNG und WENSINK, 1981, HOVEMANN und GALLER, 1982, HUNG und WENSINK, 1983), bleibt unbeantwortet, ob Vitellogenin und Vitellin bei den Insekten aus diesem Urgen entstanden sind, oder ob sich verschiedene Vitellogenin-Gene unabhängig von einander entwickelt haben.

Die Synthese des Vitellogenins setzt bei den meisten Insekten erst im Adultstadium ein. Offenbar ist es ein typisches Syntheseprodukt des imaginalen Fettkörpers. Da die Synthese des Vitellogenins nicht nur entwicklungsabhängig kontrolliert wird, sondern auch endokrin reguliert wird und zudem in hohen Raten erfolgen kann, eignet sie sich vorzüglich als Modell zum Studium sowohl entwicklungsphysiologischer Vorgänge als auch der Regulation eukaryotischer Gene.

## 2. Endokrine Regulation der Dotterbildung bei Insekten

Neben exogenen Kontrollfaktoren, wie z.B. Ernährungssituation, Photoperiode oder sozialen Faktoren, unterliegt die Dotterbildung primär einer endogenen, endokrinen Kontrolle. Anfang der 70er Jahre bestand die Vorstellung, daß die endokrine Regulation der Dotterbildung nach einem allgemeinen gültigen Schema verläuft: Das von den Corpora allata produzierte

Juvenilhormon wurde als das gonadotrope Hormon der imaginalen Insekten angesehen. Es steuert z.B. bei der Schabe Leucophaea die Dotterbildung an zwei Stellen (BROOKES, 1969, ENGELMANN, 1971): Einerseits ist es für die Synthese von Vitellogenin im Fettkörper verantwortlich, wo es die de-novo-Synthese induziert und ihre Rate kontrolliert. Andererseits reguliert es die Aufnahme des Vitellogenins in die Oocyte. Die Vitellogeninsynthese bleibt aus, wenn die Corpora allata entfernt werden. Erst nach Zugabe von Juvenilhormon bildet der Fettkörper erneut Vitellogenin. Auch wenn genügend Vitellogenin in der Hämolymphe vorliegt, findet ohne Juvenilhormon keine Vitellogenese statt (BELL und BARTH, 1971). D.h. Synthese von Vitellogenin und Vitellogenese sind durch das gleiche Hormon in verschiedenen Targetorganen unabhängig voneinander regulierte Prozesse.

## 2.1. Regulation der Vitellogenin-Synthese

Im letzten Jahrzehnt haben sich mit präziseren biochemischen Methoden differenziertere Vorstellungen über die Regulation der Vitellogenin-Synthese herausgebildet. Sie sind mittlerweile so divergent, daß ein einheitliches Konzept der Regulation bei Insekten fehlt. Drei der bestuntersuchten Modelle sollen hier kurz vorgestellt werden.

Bei Locusta induziert und kontrolliert Juvenilhormon die Synthese von Vitellogenin. Allatektomie führt zum Ausbleiben von Vitellogenin-Synthese und Oogenese. Topikale Applikation von Juvenilhormon restituiert die Normalsituation in Dosis-abhängiger Weise (CHEN et al., 1976; GELLISEN und EMMERICH, 1978). Ähnlich ist die Situation bei vielen anderen Hemimetabolen, z.B. den Schaben Periplaneta (BELL, 1969b), Nauphoeta (WILHELM und LÜSCHER, 1974; LANZREIN et al., 1978) und den Hemipteren Triatoma (MUNDALL und ENGELMANN, 1977) und Rhodnius (PRATT und DAVEY, 1972). Die Initiation der Vitellogenin-Synthese durch Juvenilhormon steht bei Locusta in Verbindung mit dem Erscheinen der Vitellogenin-mRNA und läßt eine Regulation auf transskriptionaler Ebene vermuten (CHINZEI et al., 1982).

Ganz anders die Situation bei Aedes: Kurz nach der Imaginalhäutung verursacht Juvenilhormon die Kompetenz des Fettkörpers zur Vitellogenin-Synthese (FLANAGAN und HAGEDORN, 1977) und die erste Differenzierung des Ovars (GWADZ und SPIELMAN, 1973; HAGEDORN et al., 1977). Nach einer Blutmahlzeit wird von den neurosekretorischen Zellen des Gehirns das Neurohormon EDNH (Eientwicklungs-Neurosekretorisches-Hormon) ausgeschüttet

(LEA, 1972), das das Ovar stimuliert, Ecdyson zu produzieren (HAGEDORN et al., 1979; HANAOKA und HAGEDORN, 1980). Das Ecdyson, bzw. seine vom Fettkörper hydroxylierte Form, das Ecdysteron, induziert die Vitellogenin-Synthese im Fettkörper (FALLON et al., 1974; HAGEDORN et al., 1975; BOHM et al., 1978). Daraufhin geht der terminale Follikel in Vitellogenese und nach einigen Tagen wird die erste Serie von Eiern abgelegt. Der zweite Oogenese-Zyklus wird durch Juvenilhormon initiiert, und die zweiten Follikel entwickeln sich bis zum prävitellogenen "Ruhestadium". Erst nach einer zweiten Blutmahlzeit kommt es erneut zur Ausschüttung von EDNH. Daraufhin wird wiederum Ecdyson produziert. Diese Abfolge endokriner Ereignisse findet in jedem Oogenese-Zyklus statt (RACIOPPI et al., 1984).

Etwas abweichende Verhältnisse liegen bei Drosophila vor. Hier werden die Dotterproteine nicht nur vom Fettkörper, sondern auch in den Follikelepithelzellen gebildet (BRENNAN et al., 1982). Die Syntheseaktivität des Fettkörpers wird von Ecdysteron gesteuert, Juvenilhormon dagegen induziert die Vitellogenin-Synthese im Ovar und kontrolliert die Dottereinlagerung in die Oocyte (JOWETT und POSTLETHWAIT, 1980, vgl. auch BOWNES, 1982).

Bei Hyalophora cecropia (Lepidoptera), einem Insekt mit permanenter Oogenese (TELFER und ANDERSON, 1968), wird Vitellogenin schon während der Metamorphose kurz nach der Puppen-Adult-Apolysis synthetisiert. Die Vitellogenese beginnt wenig später im pharat adulten Stadium. Die Oogenese wird schon in diesem Stadium abgeschlossen. Die Weibchen schlüpfen daraufhin schon mit der fast vollständigen Zahl vollentwickelter Eier (PAN et al., 1969; PAN, 1971). Auch ohne Corpora allata oder Corpora cardiaca wird die Vitellogenin-Synthese aufrechterhalten. Sie wird durch Juvenilhormon nicht beeinflußt (PAN, 1977). Der Schluß, daß die Vitellogenin-Synthese ohne hormonelle Kontrolle abläuft (PAN, 1971), erscheint verfrüht. Denn bei Bombyx mori, einem verwandten Schwärmer (Fam. Saturniidae), bei dem die Verhältnisse ähnlich wie bei Hyalophora liegen, kann sie in vitro durch Ecdyson stimuliert werden (ONO et al., 1975).

Bei Vertebraten findet man bezüglich der Steuerung der Vitellogenin-Synthese andere Verhältnisse vor: Die Leber als Hauptsyntheseort der Serumproteine produziert bei Oviparen auch das Vitellogenin, den Vorläufer von Lipovitellin und Phosvitin. Dessen Synthese hängt vom geschlechtsspezifisch vorkommenden Östrogen ab. Die Leberzellen beider Geschlechter reagieren aber in gleicher Weise auf eine experimentelle Stimulation durch Östrogen mit Vitel-

logeninsynthese (WALLACE und JARED, 1968; BERKING et al., 1974, WANG und KNOWLAND, 1975; TATA, 1976). D.h. die Kompetenz der Leber auf den hormonellen Stimulus ist bei den Vertebraten nicht wie bei den Insekten geschlechtsspezifisch unterschiedlich.

## 2.2. Regulation der Vitellogenin-Aufnahme

Bei vielen Insekten, wie z.B. Leucophaea (BELL und BARTH, 1971, Periplaneta (BELL, 1969b), Locusta (BAR-ZEV et al., 1975) und Oncopeltus (KELLY und TELFER, 1977) steuert Juvenilhormon die Aufnahme von Vitellogenin in vitellogene Oocyten. Der Wirkungsmechanismus selbst ist noch ungeklärt. Ein gut untersuchtes Beispiel ist ein klassisches Objekt der Insektenphysiologie, die blutsaugende Wanze Rhodnius prolixus (WIGGLESWORTH, 1936; 1943). Bei Rhodnius ist wie bei allen Insekten das Auftreten von Interzellularräumen zwischen den Epithelzellen des terminalen Follikels Voraussetzung für die Aufnahme von Vitellogenin. Die entsprechende Differenzierung des Follikelepithels ist Juvenilhormon-abhängig (ABU-HAKIMA und DAVEY, 1975). Diese sogenannte "patency" tritt nur auf, wenn der prävitellogene Follikel zuvor einem niedrigen Juvenilhormon-Titer ausgesetzt war. Der niedrige Titer wird als "prerequisite hormone priming" bezeichnet (ABU-HAKIMA und DAVEY, 1977). Er sorgt dafür, daß sich die Follikelepithelzellen so vordifferenzieren, daß sie später mit der Bildung von Interzellularräumen auf den zweiten Juvenilhormon-Stimulus antworten können. Oder anders ausgedrückt: Sie werden Vitellogenese-kompetent. Die Tatsache, daß nur ein vitellogener Follikel pro Ovariole gebildet wird, wird mit dem Auftreten eines Antigonadotropins erklärt, das die gleichzeitige Differenzierung der zweiten Follikel unterbindet (ADAMS, 1980; DAVEY und KUSTER, 1981).

## 3. Der imaginale Fettkörper: Metamorphose als Differenzierungs-Modell

Das Problem der differentiellen Antwort von Geweben auf hormonelle Stimuli läßt sich besonders deutlich an der Metamorphose von Insekten verfolgen. Die Postembryonalentwicklung der Insekten beginnt mit dem Schlupf der Larven aus dem Ei. Sie besitzen ein Exoskelett aus relativ starrer Cuticula. Daher können sie nur wachsen, wenn sie sich häuten. Bei Hemimetabolen findet von Häutung zu Häutung eine graduelle Veränderung der Organe und Gewebe statt. Bei der letzten Larvenhäutung schlüpft eine Imago. Bei Holometabolen folgt auf das letzte Larvenstadium ein Puppenstadium, in dem

keine Nahrung aufgenommen wird. Während des Puppenstadiums werden die meisten Organe beträchtlich um- oder neustrukturiert. Die Puppe häutet sich dann zur Imago.

Nach dem klassischen Modell der Entwicklungssteuerung wird die Metamorphose hormonell reguliert. Insbesondere zwei Hormone sind dabei wichtig: Das von der Prothoraxdrüse produzierte Ecdyson bzw. sein Hydroxylierungsprodukt Ecdysteron und das Juvenilhormon. Ein bestimmtes Verhältnis der beiden Hormone zueinander ist notwendig, um die sequentiellen Entwicklungsstadien abzurufen: Die medianen neurosekretorischen Zellen des Gehirns produzieren ein Neuropeptid, das Prothoracotrope Hormon (PTTH), von dessen Sequenzierung vor kurzem berichtet wurde, und das erstaunliche molekulare Homologien zum Insulin aufweist (SUZUKI und ISHIZAKI, 1984). Es wird in den Corpora cardiaca gespeichert, auf einen nervösen Reiz hin in die Hämolymphe ausgeschüttet und regt die Prothoraxdrüse zur Ecdyson-Synthese an. Ecdyson wird daraufhin in die Hämolymphe sezerniert und initiiert den Häutungszyklus.

Die Wirkung von Ecdyson besteht darin, die Apolysis, d.h. das Ablösen der alten Cuticula von der Epidermis, zu initiieren, Mitosen der Epidermiszellen zu stimulieren, die Chitinase-Aktivität zu steuern und verschiedene Enzyme, die die Sklerotisierung und Melanisierung der neuen Cuticula bewirken, zu induzieren (KARLSON und SCHWEIGER, 1961, KARLSON und SEKERIS, 1962) Insbesondere wird die Synthese der mRNA der Dopa-Decarboxylase als Schlüsselenzym der Melanin-Bildung in den Epidermiszellen stimuliert (FRAGOULI-FOURNOGERAKI et al., 1978). Während einer kritischen Periode nach der Ecdyson-Ausschüttung bestimmt der JH-Hämolymph-Titer die Qualität der Häutung. Hohe JH-Titer führen zu einer weiteren Larvenhäutung, niedrige bzw. keine JH-Titer führen zu progressiven Häutungen, d.h. zur Puppen- oder Imaginalhäutung. JH wird wegen dieser Rolle in der Metamorphose auch als "Status-quo-Hormon" bezeichnet (WILLIS, 1981). Auch JH wirkt direkt auf das Genom, indem es z.B. die Epidermis programmiert, eine für Larven charakteristische Cuticula zu sezernieren.

Die eigentliche Häutung, d.h. das Abstreifen der alten Cuticula, wird als Ecdysis bezeichnet. HINTON (1973) hat eine weitere Differenzierung der Entwicklungsstadien in sog. "pharate" Entwicklungsstadien eingeführt, die mit der Apolysis der alten Cuticula beginnen. Diese Unterscheidung ist zwar noch nicht allgemein anerkannt (WIGGLESWORTH, 1973), doch erscheint sie gerade im Hinblick auf die zugrundeliegenden physiologischen Mechanismen

angebracht, insbesondere da Ecdyson die Apolysis triggert, während das Eclosionshormon, ein Neuropeptid, die Ecdysis triggert (TRUMAN, 1976; TRUMAN et al., 1981). Somit kann man bei Holometabolen die folgenden Stadien unterscheiden: Larve, pharate Larve; letztes Larvenstadium, pharate Puppe; Puppe, pharat Adulte und Adultstadium (Imago).

Wenn verallgemeinert worden ist, die Metamorphose der Holometabolen würde im Gegensatz zu der der Hemimetabolen eine vollständige Umwandlung larvaler Strukturen in imaginale beinhalten, so trifft dies strenggenommen nur für bestimmte Gewebe zu. Als ein vorzügliches Modell für die während der Metamorphose stattfindenden Differenzierungsprozesse und die sie steuernden Mechanismen eignet sich der Fettkörper. Seine Metamorphose ist bei vielen Hemimetabolen, z.B. bei Schaben, nur graduell, da der Fettkörper morphologisch intakt bleibt (KUNKEL, 1981). Komplizierter stellt sie sich bei Holometabolen dar, bei denen zwei unterschiedliche Muster auftreten: Im einfachsten Fall, z.B. bei Mosquitos (CLEMENTS, 1963), bleiben die Fettkörperzellen intakt und überdauern ohne große Veränderungen bis ins Adultstadium. Dieser nur graduellen, quasi "hemimetabolen" Umwandlung steht im komplizierteren Fall die Metamorphose des Fettkörpers höherer Dipteren und Hymenopteren gegenüber. Hier lysieren die Zellen des larvalen Fettkörpers, ihre Bestandteile werden phagocytiert, und der adulte Fettkörper wird aus abdominalen Histoblastzellen neu gebildet (BISHOP, 1958; KEELEY, 1978).

Die morphologischen Veränderungen gehen mit funktionellen einher. Dies läßt sich z.B. anhand der Hämolymphproteine erkennen, die vor allem vom Fettkörper, dem Zentrum des intermediären Stoffwechsels der Insekten (WYATT, 1975), gebildet werden. Ihre Synthese erfolgt entwicklungsabhängig in einem spezifischen Muster (WYATT, 1980), in dem zwischen larvalen und imaginale Proteinen unterschieden werden kann. Ihnen entsprechen larvale und imaginale Gensortimente. Spezifisch pupale Syntheseprodukte des Fettkörpers konnten dagegen nicht nachgewiesen werden (THOMSON, 1975). Der Grad der Veränderung des Proteinspektrums hängt offenbar mit dem Umfang der Metamorphose zusammen (WYATT, 1968). Bei Holometabolen spiegelt er zugleich die Evolution des Puppenstadiums als Modifikation des letzten Larvenstadiums wider.

So synthetisiert z.B. der Fettkörper der hemimetabolen Schabe Blatella germanica während der Larvenphase hauptsächlich das larvale Serumprotein (LSP), im Adultstadium vor allem Vitellogenin (KUNKEL und LAWLER, 1974) Dieser reziproke Wechsel kennzeichnet zugleich seine Metamorphose-abhängige

Hauptfunktionsveränderung. Juvenilhormon kontrolliert bei Schaben die Vitellogenin-Synthese (ENGELMANN und FRIEDEL, 1974). Das Vitellogenin-Gen kann frühestens in der pharaten Larve des letzten Larvenstadiums induziert werden - wenn auch nur in geringem Maße und nach langer lag-Phase (KUNKEL, 1981). D.h. der Fettkörper der Weibchen erwirbt erst im Laufe der Metamorphose die Kompetenz, auf Juvenilhormon-Applikation mit Vitellogenin-Synthese zu reagieren. Dies unterstreicht das Konzept der schrittweisen Metamorphose bei Hemimetabolen. Kompetenz des Fettkörpers bedeutet bei diesen Insekten kein Alles-oder-Nichts-Prinzip sondern eine graduelle Zunahme der Reaktionsfähigkeit auf JH (DHADIALLA und WYATT, 1983). Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht bekannt.

Genauere Untersuchungen zur Fettkörper-Kompetenz bei Holometabolen stehen noch aus. Da auch hier Vitellogenin ein Hauptsyntheseprodukt des imaginalen Fettkörpers ist, eignet es sich zum Studium der im Fettkörper stattfindenen Differenzierungsprozesse und ihrer endokrinen Regulation.

## 4. Vitellogenin bei Honigbienen

Bei Honigbienen kommt ein weiteres interessantes Phänomen hinzu: Ihre Fertilität wird, wie bei allen eusozialen Hymenopteren, in kastenspezifischer Weise reguliert. Nur die Königin ist voll fertil. Sie unterdrückt die potentielle Fertilität der weiblichen Arbeiterinnen-Kaste pheromonal. Generell zeichnet sich die Bienenkönigin im Gegensatz zur zyklischen Oogenese vieler anderen Insekten durch permanente Oogenese aus. Ihre Eilageaktivität hängt von ihrem Alter sowie von externen und sozialen Bedingungen ab. Vitellogenin wird sowohl bei Königinnen wie auch bei Arbeiterinnen in der Hämolymphe gefunden (ENGELS, 1972).

### 4.1. Vitellogenin bei der Bienenkönigin

Das Vitellogenin der Honigbiene ist ein Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von 350.000 d (SCHABACKER, 1973 zit. nach ENGELS, 1974), das mit elektrophoretischen (ENGELS, 1972) und immunologischen Methoden (HAGMEISTER, 1976; KAATZ, 1980) identifiziert wurde. Titer und Synthese unterliegen Alters- und Entwicklungs-abhängigen Schwankungen (ENGELS, 1972; ENGELS und FAHRENHORST, 1974). Vitellogenin ist ca. 9 h vor der Imaginalhäutung in der Hämolymphe der Bienenköniginnen in Spuren nachweisbar

(KAATZ, 1980). Sein Titer steigt innerhalb weniger Tage auf ein Maximum von 70% aller Hämolymphproteine. Wenn die Königin Eier legt, fällt er auf 55%. Wird die Eilage unterbrochen, z.B. im Winter oder in Regenperioden, steigt der Titer auf bis zu 80% (ENGELS und FAHRENHORST, 1974). Offenbar akkumuliert sich das Vitellogenin in der Hämolymphe, sobald es nicht mehr in die Oocyten eingelagert wird. Die Vitellogenin-Synthese wird in der Königinnen-Imago nie völlig unterdrückt. Bei nicht eierlegenden Königinnen sinkt sie auf das Niveau anderer Hämolymphproteine. In der Phase hoher Eilageaktivität beträgt sie etwa 85% aller markierten Hämolymphproteine (ENGELS, 1972).

Zur Frage der Synthese-Regulation liegen zahlreiche Untersuchungen vor: Jungköniginnen, 2 mal mit $CO_2$ behandelt, steigern ihre Vitellogenin-Synthese auf das Doppelte (ENGELS et al., 1976). Die $CO_2$-Behandlung hat, wie schon lange bekannt ist (MACKENSEN, 1947), auf Oogenese und Neurosekretion (HERRMANN, 1969) gleiche Auswirkungen wie die Paarung: Die Königin geht in Eilage. Dagegen sinkt die Syntheseleistung, wenn eierlegende Königinnen mit $CO_2$ begast werden; nach etwa einer Woche hat sich die Situation aber wieder normalisiert (ENGELS, 1974).

Die Allatektomie von frisch geschlüpften jungen Königinnen (DAERR, 1978b) und jungen mit $CO_2$ begasten Königinnen (ENGELS und RAMAMURTY, 1976) beeinflußt Vitellogin-Synthese und Eilage nicht signifikant. Frisch geschlüpfte allatektomierte Jungköniginnen beginnen überraschenderweise zuerst Eier zu legen, unterbrechen wenige Tage später diese Tätigkeit und unternehmen dann den Hochzeitsflug (DAERR, 1978b). Vitellogenin-Synthese und Oogenese eierlegender Königinnen bleiben durch Allatektomie unbeeinflußt (HRDY und SLAMA, 1963; Van LAERE, 1974; RAMAMURTY und ENGELS, 1977). Bei den Allatektomie-Experimenten blieb außer Acht, daß Vitellogenin schon vor dem Imaginalschlupf vorkommt. Es ist deshalb durchaus möglich und durch die o.g. Experimente nicht erfaßt, daß Juvenilhormon für die Initiation der Vitellogenin-Synthese eine Rolle spielen kann.

Mehrfache Behandlungen von Jungköniginnen mit Juvenilhormon III wirken sich weder auf den Vitellogenin-Titer noch auf die Flugaktivität aus (REGEL, 1978). Langzeit-Juvenilhormon-Applikationen mit Juvenilhormon I, II und III haben relativ geringe Auswirkungen bei eierlegenden Königinnen (ENGELS, 1978). Behandlungen eierlegender Königinnen mit Precocen II (ENGELS, 1981) einem bei Hemimetabolen wirksamen Anti-Allatin (BOWERS et al., 1976), das die sekretorischen Zellen der Corpora allata zerstört (UNNITHAN et al.,

1977; SCHOONEVELD, 1979; FEYEREISEN et al., 1981) , hatten keinerlei statistisch signifikante Auswirkungen auf den Vitellogenin-Stoffwechsel. Lediglich Dosen von 3 - 8 mg pro Königin (das Gewicht einer Königin beträgt ca. 230 mg) verringerten die Vitellogenin-Syntheseleistung. Allerdings hat Precocen II, wie sich inzwischen herausstellte, keine spezifische Anti-Allatin-Wirkung bei Honigbienenlarven (REMBOLD et al, 1979) und Adulten (FLURI, 1983).

4.2. Arbeiterinnen und Drohnen

Arbeiterinnen legen in der Regel keine Eier, da ihre Oogenese durch Königinnen-Pheromone unterdrückt wird (BUTLER und FAIRLY, 1963). Nur eine begrenzte Anzahl von Arbeiterinnen im weiselrichtigen Volk hat entwickelte Ovarien, und dann meistens nur schwach entwickelte (VELTHUIS, 1985). Dennoch tritt Vitellogenin in der Hämolymphe aller Arbeiterinnen auf (ENGELS und FAHRENHORST, 1974; RUTZ und LÜSCHER, 1974). Dies kann als ein Relikt der ursprünglich allen Weibchen zukommenden Fertilität aufgefaßt werden (ENGELS und ENGELS, 1977).

Das Vitellogenin der Arbeiterinnen ist elektrophoretisch (ENGELS, 1972) und immunologisch (HAGMEISTER, 1973; RUTZ und LÜSCHER, 1974) identisch mit dem der Königin. Es kommt - wie bei Königinnen - auch schon in der Hämolymphe pharat adulter und frisch gehäuteter Arbeiterinnen vor (BRAUN, 1985). Etwa zwischen dem 6. und 10.Tag (ENGELS und FAHRENHORST, 1974) bzw. sogar bis zum 14.Tag (RUTZ und LÜSCHER, 1974) erreicht das Vitellogenin ein Maximum von etwa 32 bis 40% in der Hämolymphe. Danach sinkt der Titer allmählich ab. Nach dem Übergang von Stock- zu Flugbiene beträgt er nur noch 15-26% (FAHRENHORST, 1973; FLURI et al., 1982). Der Vitellogenin-Gehalt der Winterbienen-Hämolymphe entspricht prozentual dem der Stockbienen, absolut ist er - bedingt durch den hohen Proteingehalt der Hämolymphe - noch höher als der 12 Tage alter Sommerbienen (FLURI et al., 1977). Der Juvenilhormon-Titer liegt bei Stockbienen zwischen 250 und 1050 GU, bei Flugbienen zwischen 1400 und 2650 GU und bei Winterbienen zwischen 250 und 800 GU/ml Hämolymphe.

Allatektomierte frisch geschlüpfte Arbeiterinnen haben nach mehrtägiger Inkubation kein Vitellogenin in der Hämolymphe (IMBODEN et al., 1976). Nach Applikation niedriger Juvenilhormon-Dosen kann Vitellogenin in der Hämolymphe nachgewiesen werden. Arbeiterinnen, die mit hohen Juvenilhormon Dosen (10 µg JH III) behandelt werden, haben zunächst einen niedrigeren

Vitellogenin-Titer in der Hämolymphe. Später wird auch hier ein Titer erreicht, der dem der Arbeiterinnen gleicht, die mit einer niedrigeren Dosis behandelt wurden. Niedrige JH-Dosen, auf junge Arbeiterinnen appliziert, erhöhen den Vitellogenin-Titer in der Hämolymphe. Hohe JH-Dosen senken ihn. Zugleich verursachen sie die physiologische Umstellung in Richtung auf die Flugbiene (RUTZ et al., 1976). Flugbienen haben einen höheren Juvenilhormontiter als junge Arbeiterinnen (RUTZ et al., 1976; FLURI et al., 1982). Die Autoren schlossen daraus, daß niedrige JH-Dosen die Vitellogenin-Synthese stimulieren, hohe Dosen die Synthese hemmen.

Vitellogenin kommt, wie sonst bei Insekten nur in wenigen Fällen bekannt (vgl. LAMY, 1984), auch bei den männlichen Bienen im Laufe der Imaginalentwicklung in geringer Konzentration in der Hämolymphe vor (TRENCZEK, 1984). Juvenilhormon- und Ecdyson-Gaben beeinflussen weder den Titer (TRENCZEK, 1984) noch die Synthese von Vitellogenin (ZILLIKENS, 1984).

### 4.3. Vitellogenin bei weisellosen Arbeiterinnen

Geht in einem Bienenvolk die Königin verloren und damit auch die Quelle der Pheromone, die die Ovarentwicklung (BUTLER und FAIRLY, 1963) und den Bau von Nachschaffungszellen (VELTHUIS, 1976) unterdrücken, dann werden aus jungen Larven neue Königinnen in Nachschaffungszellen aufgezogen. Fehlt Larvenbrut im Volk, so können (mit Ausnahme der Rasse A. m. capensis) keine Königinnen mehr produziert werden. Viele Arbeiterinnen beginnen daraufhin mit der Oogenese (RUTTNER und HESSE, 1981; COUTURIER, 1984) und einige von ihnen legen unbesamte Eier. Der Vitellogenin-Gehalt der Hämolymphe weiselloser Arbeiterinnen ist deutlich erhöht (ENGELS und FAHRENHORST, 1974; RUTZ und LÜSCHER, 1974). Er ist mit dem Grad der Oogenese korreliert: Weisellose Arbeiterinnen mit prävitellogenen Follikeln haben einen niedrigeren Vitellogenin-Titer als solche mit Vitellogenese-aktiven Ovarstadien (VELTHUIS, 1976; COUTURIER, 1984). Die Vitellogenin-Synthese 12 d alter weiselloser Arbeiterinnen ist verglichen mit der weiselrichtiger Arbeiterinnen signifikant erhöht. Sie ist außerdem mit dem Grad der Oogenese korreliert: Arbeiterinnen mit Vitellogenese-aktiven Follikeln weisen eine höhere Vitellogenin-Synthese auf als Arbeiterinnen, deren terminale Oocyten prävitellogen sind. Sobald die Oogenese einsetzt, steigt auch die Vitellogenin-Synthese (BRAUN, 1985). Untersuchungen über ihre endocrine Kontrolle liegen nicht vor. Es ist lediglich bekannt, daß die Corpora allata weiselloser Arbeiterinnen größer als die weiselrichtiger

ist (MÜSSBICHLER, 1952; DREISCHER, 1956). Vom Grad ihrer Fertilität ordnet Engels (1974) die weisellosen Arbeiterinnen zwischen Königinnen und weiselrichtigen Arbeiterinnen ein.

4.4. Endocrine Regulation der Oogenese bei anderen Hymenopteren

Daten zur Regulation der Vitellogenin-Synthese liegen bei anderen Hymenopteren nicht vor, doch es gibt eine Reihe von Untersuchungen zur Steuerung der Oogenese.

So wird das Oocytenwachstum bei Halictiden (BELL, 1973) durch JH stimuliert. Auch bei subdominanten Weibchen entwickeln sich nach JH-Applikation die terminalen Oocyten. Bei Polistes gallicus ist die Oogenese dagegen mit einem erhöhten Ecdysteroid-Titer in der Hämolymphe und einer erhöhten JH-Synthese korreliert (STRAMBI et al., 1977, RÖSELER et al., 1984). Auch das Dominanzverhalten der Weibchen ist damit korreliert, ohne daß es gelang, eine schlüssige Kausalkette zu erstellen (RÖSELER, 1985).

Bei Hummeln wird die Fertilität in kastenspezifischer Weise reguliert. Nur die Königin legt Eier. Die Oogenese ihrer Töchter wird während der ersten Tage nach ihrem Schlupf unterdrückt (RÖSELER, 1974). Ein Pheromon der Mandibeldrüsen der Königin hemmt die Aktivität der Corpora allata und damit auch die Oogenese (RÖSELER et al., 1981), denn JH-Applikation auf weiselrichtige Arbeiterinnen induziert die Oogenese. Die Sterilität der jungen Arbeiterinnen ist eine Folge des niedrigen JH-Titers in der Hämolymphe (RÖSELER, 1977), der durch eine niedrige JH-Biosynthese der Corpora allata verursacht wird (ROESELER und ROESELER, 1978). Die Oogenese wird nicht vollständig unterdrückt, so daß Arbeiterinnen, die älter als 30 d sind, Eier legen können (VAN HONK et al., 1980). Fehlt die Königin, so beginnen die Arbeiterinnen wenige Tage später mit der Eiablage. Bei jungen Königinnen im Herbst bewirkt Juvenilhormon-Applikation eine Umstellung ihres Stoffwechsels, der eigentlich auf Überwinterung und Bildung von Lipid- und Kohlenhydrat-Reserven eingestellt und durch einen niedrigen Juvenilhormon-Titer gekennzeichnet ist. Stattdessen werden die Corpora allata aktiv und die Oogenese beginnt. Auch durch $CO_2$-Behandlung überwinternder Königinnen können die Corpora allata aktiviert und die Oogenese stimuliert werden (ROESELER und ROESELER, 1984). Offenbar hemmen die neurosekretorischen Zellen die Corpora allata-Aktivität, denn ihre Zerstörung hat die gleiche Wirkung wie die $CO_2$-Behandlung.

## 5. Arbeitsprogramm

Trotz der vielfältigen Untersuchungen zur Eientwicklung bei Honigbienen und verwandten Hymenopteren ergibt sich kein schlüssiges und einheitliches Bild über die sie kontrollierenden endokrinen Mechanismen. In dieser Arbeit soll deshalb das für das Riesenwachstum der Oocyten verantwortliche Vitellogenin unter dem Blickwinkel seiner Synthese und Regulation bei Königinnen als Teilprozeß der Oogenese näher untersucht werden. Dabei sollen vier Wege beschritten werden.

Da nur wenige Angaben über Hormon-Titer bei Honigbienen existieren, sollen als erstes Juvenilhormon- und Ecdysteroid-Titer im Verlauf der postlarvalen Ontogenese von Bienenköniginnen untersucht werden. Die Kenntnis der wirklich existierenden Hormontiter sollte es erlauben, Hypothesen über ihre Rolle zu definierten Entwicklungszeitpunkten zu entwerfen und in Experimenten zu überprüfen, in denen die tatsächlichen hormonphysiologischen Bedingungen restituiert werden.

Eines der Hauptprobleme bisheriger Untersuchungen war, von einigen Ausnahmen abgesehen (ENGELS, 1972; ENGELS et al., 1976), daß nur der Vitellogenin-Titer der Hämolymphe als Parameter für Experimente zur Regulation diente. Er stellt jedoch nur die statische Momentaufnahme eines dynamischen Prozesses von Synthese, Aufnahme in Zielgewebe, (evtl.) Speicherung und Abbau dar. Als Parameter sollte deshalb die den Vitellogenin-Titer mitbestimmende Vitellogenin-Synthese bei Königinnen ausgewählt und das Hämolymphprotein- und Vitellogenin-Synthese-Muster quantitativ und qualitativ im Verlauf der Ontogenese bestimmt werden. Allerdings erfordern Ontogenese-Studien die genaue Kenntnis über Dauer und Unterscheidbarkeit von Entwicklungsstadien und ihre Definition, was deshalb vorab geschehen soll.

Sobald bekannt ist, wann Vitellogenin erstmals exprimiert wird, soll als drittes geprüft werden, wie diese Expression der Vitellogenin-Synthese gesteuert ist - insbesondere ob sie Juvenilhormon-abhängig ist. Denn bisher war bei Allatektomie-Experimenten von adulten Königinnen ja übersehen worden, daß Vitellogenin schon vor dem Imaginalschlupf vorkommt.

Ferner soll viertens auf der Grundlage der vorher gewonnenen Erkenntnisse die Regulation der Vitellogenin-Synthese untersucht werden. Dazu sollen die an der Oogenese beteiligten Organe zu isoliert und ihre Physiologie in vitro untersucht werden. Denn ein in vitro-Ansatz würde ermöglichen, z.B. hormonelle Wirkungsmechanismen isoliert zu analysieren. Ist es doch

in vivo oft der Fall, daß komplexe hormonelle Wechselwirkungen einzelne funktionelle Zusammenhänge nicht erkennen lassen. Zumal der Komplexitätsgrad bei Honigbienen als hoch eusozialen Insekten noch zunimmt, weil sie in Verhalten und Physiologie zusätzlich vom sozialen Umfeld abhängig sind. Bei vielen Insekten z.B. Aedes (HAGEDORN, 1974), Bombyx (Ono et al., 1975) oder Drosophila (HANDLER und POSTLETHWAIT, 1978) war erst die Gewebekultur Schlüssel zum Verständnis der Regulation der Vitellogenin-Synthese und hat damit eine wesentlich differenziertere Betrachtung der Oogeneseprozesse ermöglicht.

Die in vitro-Kultur von Insektenzellen und -geweben hat seit den 60er Jahren einen enormen Aufschwung genommen. Damals war es gelungen, ein synthetisches Kulturmedium für Gewebe von Seidenspinnern (WYATT, 1956) zu entwickeln und auf dessen Basis erstmals erfolgreich Insekten-Zellinien zu kultivieren (GRACE, 1962). Mittlerweile sind viele Insekten-Kulturmedien und hunderte von Zellinien beschrieben worden (VAUGHN und GOODWIN, 1976; HINK, 1976, 1980). Allerdings wurde der überwiegende Teil biochemischer, physiologischer, entwicklungsbiologischer und pathologischer Arbeiten an Blattaria, Orthopteren, Lepidopteren und Dipteren geleistet (Reviews: BROOKS und KURTTI, 1971; HINK, 1972; MARKS, 1980). Hymenopteren sind in dieser Hinsicht bisher nur wenig untersucht worden. STANLEY (1968) und GIAUFFRET (1971) kultivierten als erste Honigbienen-Gewebe: Embryonale Gewebe und pupale Ovarien. Die Zellkulturen blieben für mehr als einen Monat lebensfähig, proliferierten aber nur zu Beginn der Primärkultur und konnten nicht subkultiviert werden. GROBOV et al. (1971) inkubierten erfolgreich Mitteldarmzellen adulter Arbeiterinnen und embryonale Gewebe, ohne daß es gelang, Zellinien zu etablieren. Alle Autoren versuchten, die Honigbienen-Gewebe in GRACE's Medium (1962) zu kultivieren, obwohl enorme Unterschiede zwischen larvaler und adulter Hämolymphe bei Bienen (FLORKIN und JEUNIAUX, 1974) und auch zu GRACE's Medium bestehen. VAUGHN (1971) konstatiert, daß es vorteilhaft sei, Insektengewebe und -zellen in Medium zu inkubieren, das in seiner Zusammensetzung der Hämolymphe ähnele. Deshalb erschien es notwendig, ein Kulturmedium speziell für adulte Honigbienen zu entwickeln und sodann darin Fettkörper und Ovarien zu inkubieren. Die Qualität der Inkubations-Verhältnisse sollte anhand eines in vivo-Vergleiches mit dem in vitro-Aminosäure-Einbau in Proteine als Prüfparameter verfolgt werden.

# II. Material und Methoden

## 1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen standen mir Völker von Apis mellifica carnica und carnica-mellifica-Hybriden unserer institutseigenen Versuchsbienenhaltung zur Verfügung. Lediglich die Ecdysteroid-Titer-Analysen und die Bestimmung der Juvenilhormon-Biosyntheseraten der Corpora allata in vitro wurden an nordamerikanischen Bienen (Apis mellifica ligustica) vorgenommen, die mir von Prof. Dr. Roger Morse und seinen Mitarbeitern von der Dyce-Apicultural Research Station der Cornell University, Ithaca, N.Y., USA, zur Verfügung gestellt wurden.

### 1.1. Königinnen

Bienenköniginnen wurden während der Sommersaison bis in den September hinein in weisellosen Völkern gezogen, im Spätherbst (September und Oktober) in weiselrichtigen Völkern kombiniert mit einem eintägigen Anbrüteverfahren und im Winter in kleinen weisellosen Versuchsvölkern - sog. Kirchhainer Begattungskästchen - unter künstlichen Bedingungen aufgezogen. Die verdeckelten Weiselzellen wurden in einen Thermostaten überführt, dessen Temperatur von 34,5 +/- 0,2°C der Brutnesttemperatur des Bienenvolkes entsprach (HIMMER, 1927). Die relative Luftfeuchtigkeit wurde mit wassergefüllten Schalen auf 70 - 80 % eingestellt. Beide Parameter wurden regelmäßig mit einem Thermohygrographen (LAMBRECHT, Typ 252 Ua) kontrolliert. Die Königinnen wurden bis zum Schlupf im Thermostaten gehalten und danach in Kirchhainer Begattungkästchen (KBK) eingeweiselt. Die KBK dienten als Versuchsvölker.

### 1.2. Arbeiterinnen und Drohnen

Bienenarbeiterinnen - in einigen Versuchen auch Drohnen - wurden nur als Adulte in den Versuchen eingesetzt. Von im Thermostaten gehaltenen Waben mit schlüpfender Brut wurden täglich morgens und abends die frisch geschlüpften Bienen abgekehrt und mit Opalith-Plättchen täglich wechselnder Farbe und Form gekennzeichnet. Die markierten Tiere wurden in zwei-

bis dreizargigen weiselrichtigen Magazinvölkern gehalten und bei entsprechendem Alter entnommen. Während des Winters - von Oktober bis April - stammten die Arbeiterinnen aus weiselrichtigen Völkern, die im Flugraum unseres Lehrstuhls gehalten wurden.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

| | |
|---|---|
| Acrylamid | British Drug House |
| Amplify | Amersham-Buchler |
| BSA | Böhringer |
| Ecdyson | Calbiochem |
| Ecdysteron | Calbiochem |
| Ficoll | Pharmacia |
| Juvenilhormon III | Calbiochem |
| $^3$H-Leucin | Amersham-Buchler |
| PMSF | Calbiochem |
| Protein-Molekulargewichtsmarker | Biorad und Sigma |
| SDS | British Drug House |
| Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I) | Zinsser |

Alle weiteren Chemikalien waren p.A.- oder research grade-Substanzen und stammten von Merck, Serva und Sigma - wenn nicht gesondert angegeben.

### 2.2. Pufferlösungen, Färbelösungen

#### 2.2.1. Pufferlösungen

PBS pH 6,7 (zur Organ-Homogenisierung)

8,766 g NaCl / l

3,119 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ / l

4,668 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ / l

PBS pH 7,0 (BRADFORD-Test)

3,1 g NaOH / l

13,61 g $KH_2PO_4$ / l

9,0 g NaCl / l

PBS-Azid pH 7,2 oder 7,4; 0,04 M Phosphat, 0,15 M NaCl
(indirekte Immunpräzipitation)

8,766 g NaCl / l
1,54 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ / l
7,73 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ / l
0,05% (w/v) Natriumazid

Tris-Puffer 0,3 M; pH 8,6 (bei 4°C)

15,9 g Tris / l
26,64 g Tris-HCl / l

NP40-NET-Puffer pH 7,4 (indirekte Immunopräzipitation)

150 mM NaCl
5 mM EDTA
50 mM Tris d.h. 6,61 g Tris-HCl / l und 0,97 g Tris-Base / l
0,02% Natriumazid (w/v)
0,5% bzw. 0,05% Nonidet P40 (v/v)

Borat-Puffer pH 8,4 (Ecdysteroid-RIA)

6,184 g Borsäure / l (0,1 M)
9,54 g Natriumtetraborat / l (0,1 M)
4,38 g NaCl / l (0,075 M)
Sterilfiltrieren (Millipore Millex GS 0,4 µm) und bei 4°C lagern.

Tris-SDS-Puffer pH 6,8 (Sammelgel-Puffer)

39,4 g Tris-HCl / l
2,0 g SDS / l

Tris-SDS-Puffer pH 8,8 (Trenngel-Puffer)

71,0 g Tris-Base / l
47,2 g Tris-HCl / l
2,0 g SDS / l

Tris-Glycin-Elektrodenpuffer

15,15 g Tris-Base / 5l
72,0 g Glycin / 5l
5,0 g SDS / 5l

Acrylamid-Stammlösung

30,00 g Acrylamid / 100 ml
0,80 g Bis-Acrylamid / 100 ml

SDS-Probenpuffer

6,25 ml Tris-SDS-Puffer pH 6,8
0,50 g SDS
2,50 ml Glyzerin
1,25 ml Mercaptoethanol
15,00 ml $H_2O$ dest.

Lösungen für das SDS-Polyacrylamid-Sammelgel (3%)

1,00 ml Acrylamid (Stamm)
5,00 ml SDS-Tris-Puffer pH 6,8
3,85 ml $H_2O$ dest.
5 µl TEMED
0,15 ml Ammoniumpersulfat-Lösung (10%)

Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Trenngel (5%)

5,0 ml Acrylamid (Stamm)
15,0 ml SDS-Tris-Puffer pH 8,8
9,7 ml $H_2O$ dest.
15 µl TEMED
0,3 ml Ammoniumpersulfat (10%)

Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gradienten-Trenngel (12,5%)

12,50 ml Acrylamid-Stammlösung in Tris-SDS-Puffer pH 8,8
6,25 ml Tris-SDS-Puffer pH 8,8
2,57 ml $H_2O$ dest.
10,18 g Glyzerin (87%)
10 µl TEMED
0,40 ml Ammoniumpersulfat-Lösung (1%)

2.2.2. Färbelösungen

Coomassie Brilliant Blue - Farblösung (0,25%) für Polyacrylamidgele

1,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250
gelöst in 227 ml Methanol und 227 ml $H_2O$. Filtrieren. Vor der Färbung 46 ml Eisessig hinzufügen.

Entfärbe-Lösung

30% Methanol
10% Eisessig
60% $H_2O$ dest.

Kenacid Blue R - Farblösung (Fluorographie)

5,0 g Kenacid Blue R
450 ml Methanol
450 ml $H_2O$ dest.

## 3. Methoden

### 3.1 Bestimmung und Charakterisierung von Entwicklungsstadien der Bienenkönigin

Zur genauen Altersbestimmung der Entwicklungsstadien wurden Königinnen in Magazinvölkern für 6 Stunden auf eine Brutwabe gesperrt und alle 2 Stunden auf Eiablage kontrolliert. Sobald Eier gelegt worden waren, wurde der Wabenbereich markiert und die Königin freigelassen. Die von diesen Eiern stammenden Larven wurden in Königinnenzellen umgelarvt und in weisellosen Völkern bis zum Verdeckeln der Zelle gepflegt. Die verdekkelten Zellen wurden dann in einen besonders temperaturkonstanten Klimaschrank (VÖTSCH, VTKTR 180), mit 34,5$^{O}$C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit gehängt.Durch ein mit einer Augenschere in die Weiselzelle geschnittenes Fenster wurde die Entwicklung kontinuierlich in Zeitabständen von höchstens zwei Stunden tagsüber und drei Stunden in der Nacht protokolliert. Zur Charakterisierung der Entwicklungsstadien dienten einerseits die Beobachtung der Häutungen (JAY, 1962) und andererseits die Farbtafel RAL - F 2 (RAL, 1976), mit deren Hilfe die Pigmentierung der Augen und die Verfärbung des Thorax als Folge der Sklerotі-

sierung und Melanisierung der imaginalen Cuticula bei Königinnen-Puppen und pharat Adulten bestimmt wurden. Diese äußeren Charakteristika wurden gewählt, weil sie eine schnelle Zuordnung von Königinnen in diskrete Entwicklungsstadien ermöglichten. Zwischen dem 16.05. und dem 13.07. 1984 wurden insgesamt 76 Königinnen aus vier verschiedenen Zuchtserien für die Bestimmung der Gesamtentwicklungsdauer vom Ei bis zum Schlupf untersucht. Weitere 141 Königinnen aus 11 verschiedenen Zuchtserien wurden im gleichen Zeitraum nur in ihrer Puppenentwicklung kontinuierlich verfolgt und nach Augen- und Thoraxpigmentierung charakterisiert. In dieser Arbeit wurde mit Puppenentwicklung der Entwicklungszeitraum zwischen Puppenhäutung und Imaginalhäutung bezeichnet, obwohl diese Definition eine weitere Differenzierung der Entwicklung unter Einbeziehung der Apolysis (HINTON, 1973) in Puppe und pharat Adulte, außer Acht läßt. Der Einfachheit halber schien mir diese Verkürzung zur Beschreibung der Normogenese angebracht.

### 3.2. Präparationsverfahren in vivo

#### 3.2.1. Hämolymph-Gewinnung

Um die Hämolymphe der Bienen gewinnen zu können, wurden Arbeiterinnen und Drohnen mit Stickstoff immobilisiert und mit gekreuzten Stecknadeln auf einer Wachs-Präparierschale fixiert. Larvenstadien, Puppenstadien und Königinnen blieben unbegast. Nach einem longitudinalen Schnitt mit einer Augenschere in die 3. und 4. abdominalen Tergite in der Nähe des Herzgefäßes trat Hämolymphe aus und wurde mit einer Mikrokapillare (BRANDT, 1 - 5µl oder 10 µl) aufgesaugt. Die Kapillaren wurden sofort bei -25°C tiefgefroren und bei dieser Temperatur aufbewahrt.

Die Hämolymphe von Puppenstadien wurde vor dem Einfrieren 10 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert, um noch in der Hämolymphe frei flottierende Gewebeteile und Zellen zu entfernen (vgl. II.3.8.1.).

#### 3.2.2. Homogenisierung von Ovarien

Ovarien eierlegender Königinnen wurden unter dem Binocular (WILD M 8) durch longitudinale Schnitte entlang der Pleuralnaht freigelegt und mit einer Pinzette entnommen. Sie wurden mit PBS(2x) (vgl. II.2.2.) in 1 ml

Duall-Homogenisatoren (WHEATON) homogenisiert und bei - 70°C bis zu ihrer Verwendung eingefroren und aufbewahrt.

### 3.3. Operationsverfahren in vivo

#### 3.3.1. Dekapitation von Königinnen-Puppen

Alle Operationen wurden in der Reinraumwerkbank (EHRET, Horizontal Flow System) vorgenommen, und die Instrumente wurden nach jeder Operation abgeflammt. Vor der eigentlichen Dekapitation hatte sich eine Ligatur zwischen Kopf und Thorax mit Hilfe eines sterilisierten Baumwollfadens bewährt. Dadurch wurde verhindert, daß die Puppen zuviel Hämolymphe ver lieren. Ein einfacher Knoten (2 halbe Schläge) wurde gezogen und die Fadenenden bis auf maximal 2 Millimeter gestutzt. Anschließend wurden die Königinnen-Puppen mit einer Iritektomieschere dekapitiert. Wunde und Faden wurden mit Dentalwachs verschlossen. So konnte die Hämolymphe an dieser Stelle nicht mehr austreten und die Infektionsgefahr vermindert werden.

Die Entwicklung der dekapitierten Königinnen-Puppen wurde einerseits mit der erstellten Entwicklungstabelle (vgl. III.1.) verfolgt und andererseits wurden bei jedem Experiment Puppen gleichen Alters als unbehandelte Kontrollen mit untersucht und ihre Entwicklung mit der der dekapitierten Königinnen verglichen.

#### 3.3.2. Inkubation dekapitierter Königinnen-Puppen

Damit die behandelten Königinnen-Puppen nach der Operation nicht austrockneten, wurden sie einzeln in autoklavierte Glas-Blockschälchen gelegt, die ihrerseits in Petrischalen gestellt wurden. Ein steriler, mit Wasser getränkter Wattebausch erzeugte das notwendige feuchte Kleinklima. Die Petrischalen wurden in einem Tischklimaschrank mit Umluft (VÖTSCH, Typ VTKTR 130) bei 80 % relativer Feuchte und 34,5°C inkubiert. Auch die unbehandelten Kontroll-Königinnen wurden unter entsprechenden Bedingungen inkubiert.

Bei einem der ersten Dekapitationsexperimente trat an vielen operierten Königinnen eine Pilzinfektion auf. Daraufhin wurde der Klimaschrank vor

jedem neuen Experiment desinfiziert und alle benötigten Gefäße und Instrumente außer den schon strahlensterilisierten Petrischalen autoklaviert. Bei allen folgenden Experimenten infizierten sich die operierten Königinnen nicht mehr.

### 3.3.3. Allatektomie

Die Königinnen wurden vorsichtig so in ein vorne schräg abgeschnittenes nach oben offenes Eppendorf-Reaktionsgefäß gelegt, daß Kopf und Hals - bei Adulten auch Vorderbeine - frei herausragten (Abb. 1). Der übrige Körper ruhte im Röhrchen. Ein Klebefilm-Streifen fixierte den Thorax dorsal und verschloß zugleich auch die Öffnung des Röhrchens nach oben hin. Diese Lagerung mußte insbesondere bei den außerordentlich empfindlichen Puppen angewendet werden, weil großflächigere Verletzungen der Puppenhaut zumeist letale Folgen hatten.

Abb. 1. Halterung der Königin für die Allatektomie

Das Röhrchen mit der fixierten Königin wurde danach auf die Schlauchverbindung des Operationsblocks (DAERR, 1978a) gesteckt. Die Königin wurde im permanent zugeführten Stickstoffstrom narkotisiert. Mit Baumwollfäden, die beiderseits des Halses auf der Kopfrückseite verliefen und über eine Rändelschraube gespannt werden konnten, wurde der Kopf der Königin nach vorn geneigt, der Hals überdehnt und damit das Occiputit in Spannung versetzt. Mit einem feinen Skalpell wurde entlang der Verstärkungsleisten um das Hinterhauptloch geschnitten (IMBODEN und LÜSCHER, 1975), woraufhin das Occiputit durch seine Spannung aufklappte. Einer der beiden nun sichtbaren dorsalen Tracheen-Kopfstämme wurde an seiner Gabelung durchtrennt. Darunter lag lateral am Ösophagus das gleichseitige Corpus allatum. Mit dem feinen Häkchen einer Mikro-Sonde wurden die Verbindungen des Corpus allatum - zum Corpus cardiacum, das Band zum peripheren Gewebe und das unter dem Ösophagus durchführende Muskelbündel zum zweiten Corpus allatum (vgl. VAN LAERE, 1973) - gelöst und das freie Corpus allatum entfernt.

Das zweite Corpus allatum wurde mit einer Abweichung dementsprechend entnommen: Um die Sauerstoffversorgung zumindest teilweise noch zu gewährleisten, wurde der zweite Traccheenkopfstamm nicht durchtrennt, sondern nur mit einem Häkchen zur Seite gezogen. Deshalb mußte die Entfernung des zweiten Corpus allatum partiell ohne Sichtkontrolle erfolgen.

Bei adulten Bienenköniginnen mußte während der Operation, die zwischen 10 und 20 Minuten dauerte, in vitro-Medium (vgl. II.3.9.) auf das Operationsfeld getropft werden, damit die Wunde nicht austrocknete.

Alle Corpora allata wurden sofort nach der Exstirpation mit dem Mikroskop (ZEISS, 312,5-fach vergrößert) auf ihre Vollständigkeit hin überprüft und z.T. ihr Volumen bestimmt (s.a. II.3.4.).

Dann wurden wenige Streptomycin-Kristalle in die Wunde gegeben und die Kopfverspannung gelöst, woraufhin das eingeschnittene Occiputit in seine Ausgangslage zurückklappte. Die Wunde wurde anschließend mit Dentalwachs verschlossen, das mit der U-förmigen Spitze aus 0,1 mm Kupferdraht eines Lötkolbens (ERSA minor, 6V/5W) aufgetragen wurde.

SCHEINOPERATION

Scheinoperierte Königinnen wurden bis auf die Exstirpation der Corpora allata genauso behandelt wie allatektomierte Königinnen: $N_2$-Narkose, Öffnen der Kopfkapsel, Durchtrennung des Traccheenkopfstammes, Streptomycin-Zugabe und Wundverschluß mit Dentalwachs.

WEITERE BEHANDLUNG DER OPERIERTEN KÖNIGNNEN

Die allatektomierten Puppen wurden wie die dekapitierten im Brutschrank inkubiert (vgl. II.3.3.2.). Jungköniginnen und unbehandelte Kontrollköniginnen wurden mit 6 - 8 Begleitbienen in Schlupfkäfigen für die ersten fünf Tage nach der Operation im Thermostaten bei 34,5°C gehalten. Da zwischen 12 und 45 % aller allatektomierten Jungköniginnen im Zusammenhang mit dem Hochzeitsflug verloren gehen (DAERR, 1978a), wurden die operierten sowie die unbehandelten Jungköniginnen am 6. und 7. Lebenstag für je 10 Minuten mit $CO_2$ begast, um die Oogenese künstlich zu induzieren. Nach der zweiten Behandlung wurden die Jungköniginnen ohne ihre Begleitbienen im Käfig in ein weiselloses Kleinvolk eingeweiselt.

### 3.4. Bestimmung des Volumens der Corpora allata

Die Corpora allata von Königinnen-Puppen und Imagines wurden sofort nach ihrer Exstirpation auf einen Zählkammer-Objektträger übertragen, Hämolymphe des jeweiligen Tieres wurde dann unter Binocular-Kontrolle (WILD M4 25-fach) sofort mit übertragen, ein Deckglas aufgelegt und die Fläche der Corpora allata bei 200-facher Vergrößerung im Mikroskop mit einem Okularmikrometer gemessen. Aus der gemessenen Längs- und Querachsen sowie der Höhe der Zählkammer (0,1 mm) ließ sich das Volumen der Corpora allata mit der Formel für ein Ellipsoid ($V = 4/3\ \pi\ a\ b\ c$, dabei sind a, b, und c die Halbachsen des Ellipsoids) abschätzen.

Die Form der Corpora allata ist allerdings bei der Honigbiene nur annähernd ein Ellipsoid, sie ist häufig unregelmäßig gestaltet (PFLUGFELDER, 1948), so daß die Volumenbestimmung nur einen Schätzwert darstellt. Andere Methoden, die zur Corpora allata-Volumenbestimmung herangezogen worden waren, erschienen mir jedoch mindestens ebenso ungenau: LÜSCHER und WALKER (1963) sowie auch GAST (1967) massen das Volumen einer Zählkammer von 0,025 mm Tiefe, dabei wurden die Corpora allata beträchtlich gequetscht, VAN LAERE (1971) verwendete nur die Querschnitts-Fläche als Maßstab und PFLUGFELDER (1948) und LUKOSCHUS (1956) fixierten die Corpora allata, bevor sie die Schnitte planimetrierten, ungeachtet dessen, daß gerade Drüsengewebe durch Fixierungen in ihrem Volumen stark verändert werden.

Es bleibt noch anzumerken, daß der bei Vorversuchen verwendete Insektenringer, bedingt durch seine niedrige Osmolarität, zu enormen Volumenvergrößerungen der Corpora allata führte. Bereits nach einminütiger Exposition war das Volumen mehrerer Vergleichsproben unterschiedlicher Entwicklungsstadien um mehr als 25 % gestiegen, nach drei Minuten um 57 % und nach fünf Minuten um 95 %. Aus diesem Grunde wurde die Hämolymphe des Tieres statt Insektenringer verwendet.

## 3.5. Hormonbestimmungen

### 3.5.1. Juvenilhormon-Titer-Bestimmung

#### 3.5.1.1. Prinzip

Der derzeit empfindlichste Bio-Test für Juvenilhormon ist der Galleria-Wachs-Test nach DE WILDE et al. (1968): In die Cuticula des Mesonotums von Puppen der Großen Wachsmotte Galleria mellonella L. wird ein Loch geschnitten, das anschließend mit einem Paraffin-Wachs-Öl-Gemisch verschlossen wird, in dem die Testprobe - sei es reines JH oder ein Lipidextrakt - gelöst ist. Einige Tage später wird die von der regenerierten Epidermis gebildete Cuticula untersucht. Ist an der Stelle der Verwundung pupale Cuticula aufgrund des JH-Einflusses gebildet worden, spricht man von positiver Reaktion. Imaginale Cuticula bedeutet negative Reaktion. Als Maß für die relative Konzentration dient die Galleria-Einheit (GU). Eine Galleria-Einheit ist diejenige JH-Menge pro Testtier, die in 50 % aller Testpuppen eine positive Reaktion hervorruft. Ein zentrales Problem des Bioassays ist die unterschiedliche Sensitivität für die verschiedenen natürlich vorkommenden Juvenilhormone 0, I, II und III (SCHOOLEY, 1977). Im Galleria-Bioassay reagieren die Puppen auf JH I und II etwa zehnfach sensitiver als auf JH III. Unbekannte Proben mit mehreren JH-aktiven Komponenten würden zu irreführenden Ergebnissen über die zugrundeliegenden JH-Konzentrationen führen. Glücklicherweise kommt bei Bienen nur Juvenilhormon III vor (TRAUTMANN et al., 1974; REMBOLD und HAGENGUTH, 1981), so daß dieses Problem entfällt.

#### 3.5.1.2. Durchführung des Galleria-Tests

Weil sich durch die Erfahrungen im Umgang mit dem Test vielfältige Veränderungen und Differenzierungen ergeben hatten, erschien mir eine Neubeschreibung des Galleria-Wachs-Tests erforderlich.

ZUCHTFUTTER

Das Zuchtfutter bestand aus

| | |
|---|---|
| 900 g | Honig |
| 800 g | Glyzerin (87%) |
| 100 g | Bienenwachs |
| 400 g | Futterhefe |
| 1.500 g | Weizen-Vollkornschrot (Typ 1800) |

Honig, Wachs und Glyzerin wurden zusammen solange erhitzt, bis das Wachs geschmolzen war. Daraufhin wurden alle Bestandteile des Futters miteinander vermengt. Das Futter war über Monate hinweg bei Raumtemperatur lagerfähig.

## ZUCHT DER WACHSMOTTEN

Die adulten Wachsmotten wurden in einem verzinkten Eisenblechkasten gehalten, der mit einem Acrylglasdeckel mit eingelassener Schiebetür verschlossen und über Kupfergaze-bespannte Öffnungen im Deckel belüftet war. Auf Papierstreifen, die in die Kammer hingen, legten die Weibchen ihre Eier ab. Diese Streifen wurden alle zwei Tage erneuert und dann zusammen mit Futter in Polystyrolkästchen gelegt. Im Brutschrank bei 30°C inkubiert, wuchsen die Larven heran und wurden ab einem Gewicht von 230 mg abgesammelt und in Kästen mit 4-fach siliconisierten (SERVA) Glasröhrchen von einem Innendurchmesser von 5 mm und 30 mm Länge gesetzt, in denen sie sich verpuppten. Ein Teil der Puppen wurde operiert, alle anderen Puppen wurden in den großen Zuchtkasten zurückgeführt.

## OPERATION DER PUPPEN

Die verwendeten Galleria-Puppen waren nicht älter als 12 Stunden, weil die Epidermis älterer Puppen schon imaginal determiniert ist (WOLBERT, 1984). Sie wurden mit 1 M NaOH von ihren Kokons befreit (DE LOOF und VAN DE VEIRE, 1972), abgespült und mit $CO_2$ für 30 Minuten betäubt. Mit einem Skalpell wurde ein etwa $1mm^2$ großes Loch in die Cuticula des Mesonotums geschnitten. Die Wunde wurde dann mit verflüssigtem Paraffin verschlossen, in dem eine bestimmte Verdünnung von JH III oder eines Hämolymphextraktes gelöst war. Dies geschah mit Hilfe einer löffelartig verbreiterten, austauschbaren Kupferspitze eines Lötkolbens (ERSA) (DE LOOF und VAN DE VEIRE, 1972). Die Kupferspitzen mußten vor ihrer Verwendung 2x ausgeglüht werden, um Restkontaminationen zu entfernen.

Pro Verdünnungsstufe wurden 25 Galleria-Puppen operiert. Diese große Zahl war erforderlich, da neben der individuellen Reaktionsbereitschaft der Wachsmotten auch die Auftragsmenge an Paraffin eine Rolle spielte: Wurde statt 1 mg JH-haltigen Paraffins 3 mg auf die Wunde gleicher Wundfläche aufgetragen, so reagierten weitaus mehr Puppen positiv. Vermutlich diffundierte das JH auch aus entfernteren Bereichen des Wachspfropfes in die Wundregion und entfaltete dort seine Wirkung.

| Auftragsmenge an JH-haltigem Paraffin | Reaktion positiv | negativ | indifferent |
|---|---|---|---|
| 1 mg/Wunde | 4 | 10 | 5 |
| 3 mg/Wunde | 19 | 1 | 0 |

Es war bei diesem Experiment eine JH-Konzentration ausgewählt worden, die in etwa 50% positiver Reaktion hervorrufen sollte.

AUSWERTUNG

Die operierten Puppen wurden 5 1/2 Tage bei 30°C im Brutschrank gehalten, dann war die Cuticula neu gebildet und die Wachsmotten schlüpfreif. Unter dem Binocular wurde das Wachs vorsichtig entfernt und die darunterliegende Cuticula hinsichtlich ihrer Differenzierung ausgewertet: Pupale Cuticula, mit ihrer typischen Härte und den charakteristischen Erhebungen, bedeutete positive Reaktion der regenerierten Epidermis. Die Reaktion war negativ, wenn imaginale, glatte Cuticula ausgebildet war, und indifferent, wenn weder eindeutig pupale noch eindeutig imaginale Cuticula vorlag.

Pro Verdünnungsstufe wurde der Prozentsatz positiver Reaktionen errechnet. Zur Bestimmung einer Galleria-Einheit wurde die dem 50 %-Wert - positiver Reaktion zugehörige Verdünnung durch logarithmische Regression der Werte zwischen der letzten Verdünnungsstufe mit 100 % positiver Reaktion und der ersten Verdünnungsstufe mit 0 % positiver Reaktion ermittelt.

Eine Galleria-Einheit entspricht derjenigen (in einer Verdünnung enthaltenen) JH-Menge pro Testtier, bei der 50 % der operierten Gallerien eine positive Reaktion zeigen:

$$1\ GU = \frac{1}{2^x} \cdot y/z$$

x = Verdünnungsstufe: Ausgangsverdünnung V1, dann V2,...

y = mg Paraffin der Verdünnung

z = durchschnittliche Auftragsmenge pro Wachsmotte

Damit enthält der Extrakt

$$GU_{Probe} = 2^x \cdot y/z \quad ,$$

denn in der Ausgangslösung (Verdünnung V1) ist das 0,5-fache der Extraktmenge enthalten ($= \frac{1}{2^1}$), in der nächsten Verdünnung (V2) das 0,025-fache ($= \frac{1}{2^2}$) usw.

3.5.1.3. Erstellen einer Verdünnungsreihe

EICH-VERDÜNNUNGSREIHE

Mit einer Pipettierhilfe (EPPENDORF) wurden jeweils 100 µl dünnflüssiges Paraffinöl (MERCK 7174) in 1,5 ml Polypropylen-Reaktionsgefäße pipettiert[1]. Nur in das erste Gefäß der Reihe wurde 500 µg JH III, in Hexan gelöst, gegeben und mit 200 µl Paraffinöl versetzt. Das Hexan wurde unter einem $N_2$-Strom abgedampft und das Gemisch zwei Minuten lang auf dem Schüttler geschüttelt.

100 µl der Ausgangslösung (V1) wurden in das zweite Gefäß der Verdünnungsreihe pipettiert, und das Gefäß für zwei Minuten geschüttelt. Mit dem zweifachen Verdünnungsfaktor wurde die Verdünnungsreihe bis zur 18. Verdünnungsstufe fortgesetzt.

Eine den Verdünnungsstufen entsprechende Zahl gereinigter Objektträger (25 x 76 mm) wurde mit Silikonpaste (Baysilon mittelviskos, BAYER) eingerieben und auf eine Wärmeplatte (57°) gelegt. Je 89 mg Paraffinöl (MERCK 7153) wurden auf den Objektträgern zum Schmelzen gebracht und dann mit den entsprechenden Paraffinöl-JH-Verdünnungsstufen mit Hilfe eines Glasstabes 30 sec. lang vermengt. Die so erhaltenen JH-Verdünnungen in Paraffin erstarrten bei Raumtemperatur und wurden bei -30°C gelagert.

[1] Die Polypropylen-Pipettenspitzen hatten sich gegenüber den in der Literatur erwähnten Glaskapillaren (u.a. DE WILDE et al., 1968) bewährt, weil die durch die große Viskosität des Paraffinöls bedingten Verschleppungsfehler bei Pipettenspitzen nur 1% betrugen, bei Glaskapillaren hingegen bis zu 10%. Die Pipettenspitze mußte allerdings vor ihrer Verwendung inwändig mit Paraffinöl benetzt worden sein, damit das pipettierte Volumen entsprechend exakt war.

VERDÜNNUNGSREIHEN DER HÄMOLYMPH-EXTRAKTE

Die Lipid-Extrakte der Hämolymphe wurden in 200 µl Paraffinöl gelöst und wie die Eichkurve verdünnt und weiterbehandelt.

Als Kontrollen dienten in beiden Fällen Proben, die nur reines Paraffinöl vermengt mit 89 mg Paraffin enthielten. Bei Vorversuchen hatte sich herausgestellt, daß bestimmte Substanzen im Galleria-Wachs-Test von sich aus schon JH-aktiv waren. Vor allem galt das für die festen Paraffine: Paraplast (LANCER, Sherwood Medical, USA), Paraffin (BAKER 9508), Paraffin fest (MERCK 7163). Als inaktiv im Test hatten sich nur Chargen von "Paraffin in Blockform" (MERCK 7153) und reines Octacosan (EGA) erwiesen, die dann auch im Wachs-Test eingesetzt wurden.

3.5.1.4. Juvenilhormon-Extraktion

Die Extraktion des Juvenilhormon aus der Hämolymphe erfolgte in Anlehnung an die Methode von BERGOT et al. (1981). Diese Methode wurde mit der Extraktionsmethode nach DE LOOF et al. (1976) verglichen und ermöglichte dreifach höhere Ausbeuten (Tab. 1). Die Unterschiede sind im U-Test statistisch signifikant, obwohl der Galleria-Wachs-Test selbst durch die große Zahl von Versuchsschritten und die Verwendung von Versuchstieren als Indikatoren mit einem Fehler behaftet ist, der in der Größenordnung von einer Verdünnungsstufe liegt.

Tab. 1 Vergleich der Extraktionsmethoden für Juvenilhormon nach DE LOOF et al. (1976) und BERGOT et al. (1981)

Ammenhämolymphpool, n=3

| Extraktionsmethode | GU/ml Hämolymphe | s |
|---|---|---|
| BERGOT et al. | 5436 | 3261 |
| DE LOOF et al. | 1765 | 829 |

Zur Extraktion wurde ein 100 ml Scheidetrichter mit 13 ml destilliertem Pentan und 50 ml Aqua bidest gefüllt, in letzterem waren 2 g NaCl gelöst. Um JH-Kontaminationen restlos zu entfernen, war der Scheidetrichter - wie alle anderen bei der Extraktion verwendeten Glaswaren - 4 bis 6 Stunden lang im Muffelofen bei 550°C erhitzt worden.

2 ml eisgekühltes Acetonitril (RIEDEL-DE HAEN) wurde in ein ebenfalls gekühltes Spitzkölbchen pipettiert. Die zu extrahierende Hämolymphe wurde tropfenweise in das währenddessen geschüttelte Spitzenkölbchen gegeben, und das Gemisch wurde für zwei Minuten durch Schütteln homogenisiert. Anschließend wurde 5 min bei 2000 g im Kühlen zentrifugiert und der Überstand in den vorbereiteten Scheidetrichter übertragen.

Das Präzipitat wurde viermal mit 1 ml Acetonitril reextrahiert, dabei halfen Glasperlen beim Resuspendieren. Der Überstand wurde wie vorher in den Scheidetrichter pipettiert.

Danach wurde der Scheidetrichter fünf Minuten lang vorsichtig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde das Wasser über den Ausfluß entfernt. Die organische Phase wurde noch einmal mit 15 ml Aqua bidest gespült, das 0,6 g NaCl enthielt. Die Pentan-Phase wurde daraufhin in ein Spitzkolbchen überführt und mit dem Rotationsverdampfer eingeengt.

Der eingeengte Extrakt wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie (TLC) gereinigt (LANZREIN et al., 1975). Die Probe wurde auf eine aktivierte Kieselgel-TLC-Platte (MERCK, Kieselgel 60 $F_{254}$) aufgetragen. Als Marker diente 20 µg in Pentan gelöstes JH III. Nach der chromatographischen Auftrennung in Benzol-Ethylacetat (15,67:1) wurde derjenige Kieselgelbereich der Probe, der der Position des durch UV-Licht sichtbar gemachten Markers entsprach, von der Platte abgekratzt und viermal mit 2 ml n-Pentan eluiert, zentrifugiert, und die Überstände im Rotationsverdampfer fast bis zur Trockenheit eingedampft. Der Extrakt war damit soweit vorbereitet, daß er in Paraffinöl aufgenommen und verdünnt werden konnte (vgl. 3.5.1.3.).

Um die Extraktionsausbeute zu bestimmen, wurden 5 µg JH III bei der Kontrollgruppe direkt in Paraffinöl verdünnt, in der Vergleichsgruppe erst mit 50 µl Hämolymphe frisch geschlüpfter Drohnen vermischt und dann nach o.g. Methode extrahiert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen, weil die gruppeninternen Schwankungen bedingt durch den Bioassay zu groß waren:

| Verfahren | n | GU/5 µg JH III | s |
|---|---|---|---|
| JH direkt verdünnt | 3 | 454 540 | 173 435 |
| JH extrahiert | 3 | 473 190 | 198 770 |

Damit ließ sich nur schließen, daß die Extraktionsverluste kleiner als die statistische Schwankung des Assays waren.

### 3.5.2. Bestimmung der Juvenilhormon-Biosyntheseaktivität der Corpora allata von Bienenköniginnen

#### 3.5.2.1. Inkubation der Corpora allata

Die Bestimmung der Juvenilhormon-Biosynthese wurde in Anlehnung an die Arbeiten von PRATT und TOBE (1974), TOBE und PRATT (1974) in vitro durchgeführt. Alle Präparationsinstrumente und Inkubationsgefäße waren vor Beginn des Versuches sterilisiert worden . Als Inkubationsmedium für die Corpora allata diente TC 199 (MORGAN et al., 1950) mit HANK's Salzlösung (GIBCO), dem zusätzlich noch 25 mM HEPES als Puffer und 70 mg/ml Ficoll MW 400 000 zugesetzt worden waren.

Zuerst wurden die Corpora allata der entsprechenden Königinnen freipräpariert (vgl. II.3.3.3.) - mit der einzigen Veränderung, daß bei der Präparation beide Haupttracheenäste durchtrennt wurden.

Daraufhin wurden die Corpora allata mit Hilfe einer an ihrer Spitze hakenförmig gebogenen Insektennadel (minute pin) in Hohlschliffobjektträger überführt, die mit dem sterilen Inkubationsmedium gefüllt waren. Dort wurden sie paarweise mehrmals mit dem Medium gespült und dann in 3 ml fassende, konische Zentrifugengläser als Inkubationsgefäße transferiert. Die Zentrifugengläser enthielten 50µl Methionin-freies TC 199-Medium, dem L Methyl-$^{14}$C -Methionin mit einer spezifischen Aktivität von 56,7 mCi/mmol und einer radioaktiven Konzentration von 25 µCi/ml Medium zugesetzt worden war.

Nachdem die Corpora allata paarweise in die Inkubationsgefäße übertragen worden waren, wurden die Zentrifugengläser mit Parafilm verschlossen und bei 34,5$^{o}$C im Wasserbad unter Schütteln (80 Upm) für 4 1/2 Stunden inkubiert.

#### 3.5.2.2. Abbruch der Inkubation

Die Inkubation wurde abgebrochen, indem nacheinander
50 µl 1 % Na-EDTA
100 µl Methanol (100 %) und
500 µl Chloroform hinzupipettiert wurden.

Nach kurzem Mischen wurden die Proben solange bei - 20$^{o}$C gelagert, bis alle Ansätze des Versuches auf einmal aufgearbeitet werden konnten. Als Kontrolle diente reines TC 199-Medium mit Tracer, dem direkt vor Abbruch der Inkubation je 2 Corpora allata zugegeben wurden.

3.5.2.3. Aufarbeitung der Proben und Bestimmung der JH-Syntheseaktivität

Zuerst wurden in jedes Inkubationsgefäß 20µg JH III-Standard pipettiert, und die Probe geschüttelt. Dann wurde jedes Gefäß bei 3000 g für 10 min zentrifugiert, damit sich die Phasen trennten. Die Chloroformschicht wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt und auf eine kleine Natriumsulfat-Säule aufgetragen. Mit 250 µl Chloroform wurde das Medium reextrahiert. Nach der erneuten Zentrifugation wurde die Chloroformphase auch auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in einem kleinen Reagenzglas (10 x 75 mm) aufgefangen und die Säule noch zweimal mit Chloroform gewaschen. Das Chloroform in dem kleinen Reagenzglas wurde dann unter Stickstoffstrom fast bis zur Trocknung eingedampft und schließlich in 75 µl Diäthyläther aufgenommen.

Dieser Extrakt wurde dann auf eine zweimal mit Methanol gewaschenen Kieselgelplatte (Merck 60 $F_{254}$) aufgetragen. Das jeweilige Reagenzglas wurde noch zweimal mit 75 µl Diäthyläther gespült. Alle nacheinander auf die Platte aufgetragenen Proben wurden mit frischem Methanol auf einer markierten Linie 4 cm oberhalb der Unterkante der Platte fokussiert. Danach konnten die Proben mit 100 ml 75 % Xylols und 25 % Ethylacetat dünnschichtchromatographisch aufgetrennt werden. Anschließend wurde die Platte sorgfältig getrocknet.

Unter UV-Licht (254 nm) wurde der JH-Standard jeder Probe als Fleck sichtbar, markiert und von der Platte gekratzt. Die Aktivitäten der Proben wurden direkt nach Zugabe des Scintillators (Aquasol, 10 ml/Gefäß) gemessen.

3.5.3. Bestimmung des Ecdysteroid-Titers der Hämolymphe

3.5.3.1. Prinzip

Der Ecdysteroid-Titer wurde mit einem Radioimmunoassay für Ecdyson nach BORST und O'CONNOR (1972, 1974) und dem Antiserum von HORN (1976) bestimmt. Das Antiserum bindet sowohl Ecdyson als auch Ecdysterone mit hoher Affinität. Es ist hochspezifisch für das Ecdysteroid-Grundgerüst und hat die höchste Affinität für Ecdysteron. Außerdem kreuzreagiert es mit einigen Metaboliten (REUM und KOOLMAN, 1979).

3.5.3.2. Hämolymph-Extraktion

Die Hämolymphe wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 200 µl 4°C kaltem Methanol versetzt. Das Methanolvolumen betrug mindestens das Zehnfache des zu extrahierenden Probenvolumens. Die empfohlene Butanol-Wasser (1:1)-Extraktion (MORGAN und POOLE, 1976), um nur die polaren Komponenten zu erhalten, konnte entfallen, weil in der untersuchten Hämolymphe nur so wenige Konjugate vorkamen, daß sich die Aktivitäten einer Probe im Radioimmunoassay mit oder ohne Butanol-Wasser-Extraktion nicht meßbar unterschieden.

Nach intensivem Schütteln wurde für drei Minuten in einer Beckman Microfuge B bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und gesammelt und das Pellet noch zweimal mit je 200 µl 50 % Methanol reextrahiert. Die Überstande wurden vereinigt und in einem Trockenschrank bei 40 °C unter Vakuum von 380 mm Hg in einer $N_2$-gefluteten Kammer eingedampft.

Der eingedampfte Extrakt wurde anschließend in 110 µl Boratpuffer (vgl. II.2.2.) aufgenommen, nocheinmal zentrifugiert und 100 µl des Überstandes für die Bestimmung verwendet.

3.5.3.3. Radioimmunoassay

1. Lösungen

a. Kontrollserum
Das Kontrollserum setzte sich aus 4 g BSA, 1 g Rinder-Gamma-Globulinen und 20 mg Natriumazid, gelöst in 100 ml Wasser zusammen. Vor Gebrauch wurde eine tiefgefrorene 1,6 ml Portion mit 2,4 ml Boratpuffer verdünnt.

b. Spezifisches Antiserum
20 µl Anti-Ecdyson-Serum (HORN I-2) wurden mit 3,5 ml verdunntem Kontrollserum versetzt.

c. $^3$H-Ecdyson-Lösung
Aus der $^3$H-Ecdyson-Stammlösung (68 Ci/mM) in Benzol-Methanol (7:3) wurde soviel Tracer entnommen, unter Stickstoff-Strom eingedampft und in Boratpuffer aufgenommen, um pro Teströhrchen 12 000 dpm in 50 µl Boratpuffer applizieren zu können.

2. Proben für den RIA

Als Proben wurden erstellt:

a. Standardkurve von Ecdyson zwischen 25 pg und 1.000 pg/100 µl Borat-Puffer in doppelter Ausführung. Die Standards wurden als 100 µl-Aliquoten in 6 x 50 mm Reagenzgläser (CIMEX) pipettiert.

b. Kontrollen :
Nicht-Ecdysteroid-spezifische Serum-Kontrolle (3.5.3.3.1.a)
Ecdysteroid-spezifische Serum-Kontrolle
Beide Kontrollen wurden doppelt angesetzt, zuerst wurden die Gefäße nur mit 100 µl Boratpuffer gefüllt.

c. Unbekannte Proben:
Die Hämolymphextrakte wurden (s.III.2.2.2.) als 100 µl-Portionen in die Reagenzgläser (6 x 50 mm) pipettiert.

3. Durchführung

In jedes so vorbereitete Reagenzglas wurden zuerst 50 µl der $^{3}$H-Ecdysonlösung (1.c.) pipettiert. Dann wurden zu den Nicht-Ecdysteroid-spezifischen Serum-Kontrollen 50 µl des Kontrollserums (1.a.) gegeben und sofort vorsichtig geschüttelt.

Zu allen anderen Proben wurden 50 µl des spezifischen Antiserums (1.b.) gegeben und diese sofort vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden alle Proben für zwei Stunden bei 37$^{o}$C im Wasserbad inkubiert. Dann wurden sie unverzüglich in ein Eisbad gestellt und in der Kälte weiter aufgearbeitet.

200 µl 50 % gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (1:1 mit Boratpuffer verdünnte gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung) wurden zu jeder Probe gegeben, und die Proben sofort geschüttelt. Nach zweistündiger Inkubation im Eisbad wurden die Reagenzgläser bei 2 000 g abzentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Die Präzipitate wurden noch einmal mit je 400 µl 50 % gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen, dann zentrifugiert und die Überstände erneut abgesaugt.

Das jeweilige Präzipitat wurde in 500 µl RIA-Fluor (NEN) durch Schütteln aufgenommen und die gebundene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

Die aus der Standardkurve ermittelte RIA-Aktivität der Proben entspricht pg Ecdyson-Äquivalenten.

## 3.6. Proteinbestimmungen

### 3.6.1. Quantitative Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Hämolymphproben wurde mit der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Als Referenz diente Rinderserumalbumin. Die Farbreaktion wurde bei $\lambda$ = 595 nm gemessen.

### 3.6.2. Hämolymphproteinmuster

#### 3.6.2.1. Prinzip

Das Muster der Hämolymphproteine wurde mit nativen und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen im diskontinuierlichen Puffer-System von LAEMMLI (1970) analysiert. Diese Methode trennt die Proteine mit hoher Auflösung voneinander. Gleichzeitig kann ihr Molekulargewicht im Vergleich mit Proteinstandards bestimmt werden.

#### 3.6.2.2. Native Polyacraylamid-Gel-Elektrophorese

Die Proteine wurden unter "nativen" Bedingungen in Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, die je nach Fragestellung Acrylamid-Konzentrationen zwischen 4 und 12,5% besaßen. Das Sammelgel enthielt 3 % Acrylamid. Alle Lösungen (s. II.2.2.) wurden ohne SDS verwendet.Die Proteinproben wurden in Probenpuffer pH 6,8 aufgenommen, der ohne SDS und Mercaptoäthanol hergestellt worden war und statt Glyzerin 20% Saccharose enthielt. Sie waren bei 15 mA/gel nach ca. 30 min in das Trenngel gewandert. Die Elektrophorese lief dann noch etwa 3 h bei einer Stromstärke von 20 mA/Gel. Die Gele wurden danach mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (s. II.2.2.) für 3 h gefärbt, die Proteine fixiert und dann so lange entfärbt, bis der Hintergrund im Gel wieder klar war. Schließlich wurden sie im Durchlicht photographiert (Agfa pan 25; Orangefilter, HAMA, CENEI).

MOLEKULARGEWICHTSBESTMMUNG

Die Schätzung des Molekulargewichtes von Proteinen in nativen PA-Gelen erfolgt nach der Methode von HEDRICK und SMITH (1968). Die Autoren beschreiben, daß der Logarithmus der relativen Wanderungsstrecke eines Proteins in linearer Beziehung zur Gelkonzentration und die Steigung dieser Gerade in linearem Verhältnis zum Molekulargewicht steht. Als Markerpro-

teine dienten

| | |
|---|---|
| Thyroglobulin | 669 000 d |
| Ferritin | 440 000 d |
| Katalase | 232 000 d |
| Lactat-DH | 140 000 d |
| BSA | 67 000 d |

3.6.2.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Analyse der Polypeptidfraktionen wurden die Hämolymphproteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Je nach Fragestellung variierte die Acrylamidkonzentration im Trenngel zwischen 5 und 12,5 %. Dabei wurden sowohl einfache Konzentrationen als auch lineare Konzentrations-Gradienten verwendet. Zur Herstellung von Gradientengelen wurde der höher konzentrierten Lösung noch 24 % Glyzerin zugesetzt, weil der Gradient dadurch schärfer wurde. Die unterschiedlich konzentrierten Lösungen schichteten sich entsprechend ihrer Dichte ohne sich zu durchmischen. Die Gele hatten ein 3%-iges Sammelgel. Die Polymerisation von Trenn- und Sammelgelen wurde durch einstündige Inkubation in einem Thermostaten bei 50°C standardisiert. Alle zugehörigen Lösungen sind unter II.2.2. aufgeführt.

Die Hämolymph-Proben wurden mit dem vierfachen Volumen von SDS-Probenpuffer versetzt, geschüttelt, bei 10 000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand für 5 min in kochendem Wasser erhitzt. Einigen Proben eines Gels wurde 0,01% Bromphenollösung zur Lauffrontmarkierung zugesetzt. Die Trennung der mit Mikrokapillaren applizierten Proben erfolgte in einem 1,5 mm dicken Gel auf einer Länge von 11 - 13 cm bei Stromstärken von 15 mA/Gel über Nacht oder 20 mA/Gel für die erste halbe Stunde und dann für 6 h bei 40 mA/Gel. Schließlich wurden die Gele wie die nativen Gele gefärbt und photographiert.

MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG

Die Molekulargewichte der in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine wurden bei einfachen Gelkonzentrationen aus ihren relativen Wanderungsstrecken bestimmt (SHAPIRO et al., 1967). In Gradientengelen wurden sie je nach Güte der logarithmischen Anpassung nach LAMBIN (1976, 1978) oder nach SHAPIRO et al. (1967) bestimmt.

Als Molekulargewichtsmarker dienten den Gelen wahlweise:

| | Molekulargewicht (d) | | |
|---|---|---|---|
| | BIORAD | SDS-6H | SDS-VII-L |
| Myosin | 200 000 | 205 000 | |
| ß-Galaktosidase | 116 250 | 116 000 | |
| Phosphorylase b | 92 500 | 97 400 | |
| BSA | 66 250 | 66 000 | 66 000 |
| Ovalbumin | 45 000 | 45 000 | 45 000 |
| Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-DH | | | 36 000 |
| Carboanhydrase | | 29 000 | 29 000 |
| Trypsinogen | | | 24 000 |
| Trypsin-Inhibitor (Sojabohne) | | | 20 100 |
| -Lactalbumin | | | 14 200 |
| SDS-6H und SDS-VII-L waren von SIGMA | | | |

## 3.7. Immuntechniken

### 3.7.1. Herstellung eines Vitellogenin-spezifischen Antikörpers

Die im Labor zuvor angewandten Methoden, einen Antikörper gegen Vitellogenin mit präparativer Cellogel-Elektrophorese (HAGMEISTER, 1976; KAATZ, 1980) sowie der Line-Immunelektrophorese mit polyspezifischen Antikörpern gegen Bienenhämolymphe (TRENCZEK, 1984) herzustellen, hatten letztlich nicht zu einem monospezifischen Antiserum geführt. Daher wurde ein neuer Ansatz mit Hilfe der präparativen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unternommen.

#### 3.7.1.1. Präparative SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Ein 3 mm dickes Trenngel mit linearem Acrylamid-Gradienten von 4-6% wurde gegossen und mit einem 3%-igen Sammelgel überschichtet (s. II.3.6.2.). Die Dicke des Gels erlaubte den Einsatz großer Probenmengen und lieferte zugleich noch scharfe Banden. Als Proben dienten jeweils 160 ul Ammen-Hämolymphe pro Gel, die, versetzt mit dem vierfachen Volumen an Probenpuffer und 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt, über die ganze Breite des Gels aufgetragen wurde. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 25 mA/Gel oder tagsüber nach 30 min bei 25 mA/Gel für 7 h bei 50 mA/Gel durchgeführt.

Nach Abbruch der Elektrophorese wurde das Gel sofort in frisch angesetzter Lösung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 so kurz wie möglich gefärbt, damit die Proteine nur wenig im Gel fixiert wurden. Nach 15 Minuten waren die Hauptbanden schon sichtbar und die Färbung konnte abgebrochen werden. Das Gel wurde für 25 min mit viermal ausgetauschtem, destilliertem Wasser entfärbt. Auf Methanol und Eisessig wurde verzichtet, um die Proteine nicht weiter zu fixieren und darüberhinaus die Schadwirkung für das zu injizierende Kaninchen zu vermindern.

Die Vitellogenin-Bande ließ sich anhand des spezifischen Musters von Arbeiterinnen-Hämolymphe im erkennen (vgl. III.3.). Darüberhinaus wurde ein Stück des ausgeschnittenen Gels in einem Kontrollgel mit Arbeiterinnen-Hämolymphproteinen direkt verglichen. Die dem Vitellogenin entsprechende Polypeptid-Bande wurde mit einer Rasierklinge exakt an der Lauffront der Bande ausgeschnitten. Ihre Randzonen wurden verworfen. Der Gelstreifen wurde bis zu seiner Verwendung bei -25$^{O}$C eingefroren und gelagert.

Bei der Präparation des ersten Antiserums wurde wie oben beschrieben verfahren. Das gewonnene Antiserum zeigte aber anschließend, als es mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese (s. II.3.7.3.) auf Reinheit geprüft wurde, neben einer Hauptfraktion noch mindestens sechs schwächere Präzipitationspeaks, die mit dem Hauptpeak nicht konfluierten. Deshalb wurde ein neues Antiserum hergestellt, indem ein aus der präparativen SDS-PAGE gewonnener Gelstreifen in einem zweiten präparativen Polyacrylamid-Gel (4-6%) elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Das mit Gelstreifen aus der zweiten Dimension hergestellte Antiserum war nach den Kriterien der zweidimensionalen Immunelektrophorese monospezifisch gegen Vitellogenin.

3.7.1.2. Injektionsschema und Serumgewinnung

Pro Injektion wurde ein 6 cm langer, VG-haltiger Gelstreifen unter sterilen Bedingungen in eine Spritze gelegt, nachdem er zuvor dreimal für 5 min in steriler 0,9 % iger Saline gewaschen worden war. Die Spritze wurde über einen Adapter mit einer gleichgroßen Spritze verbunden. Zu dem Gelstreifen wurden dann noch 0,45 ml komplettes FREUND'sches Adjuvans und 0,45 ml sterile Saline (0,9 %) gegeben. Indem die Inhalte zwischen den beiden Spritzen hin und her gepreßt wurden, entstand ein gleichmäßiges Homogenat, das den Kaninchen entlüftet mit einer weiten Nadel (21 Guage) subcutan in den Rücken injiziert wurde.

Nach der ersten Injektion folgten 11, 25, 32 und 39 Tage später die Boosterinjektionen mit der gleichen Menge an Antigen. Der Antikörper-Titer wurde nach der zweiten Booster-Injektion wöchentlich quantitativ mit der Radialen Immunodiffusion nach MANCINI (1965) und qualitativ mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach LAURELL (1965) analysiert.

Als der Antikörper-Titer nicht mehr zunahm, wurden den Kaninchen in Abständen von 2 Tagen bis zu 40 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Das Blut wurde 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, damit es vollständig gerinnen konnte. Dann wurde 5 min lang bei 1 000 g zentrifugiert, und der Überstand nocheinmal 10 min bei 2 000 g zentrifugiert. Das Serum wurde in kleinen Portionen bei -30°C eingefroren und gelagert.

#### 3.7.1.3. Titration der Antiseren

Bevor die Antiseren eingesetzt wurden, wurden sie mit Hämolymphe 0 Tage alter Drohnen und Hämolymphe von Arbeiterinnenpuppen im Rotaugenstadium titriert. Das jeweils benötigte Antiserenvolumen wurde solange mit abnehmenden Hämolymphmengen versetzt, bis nach einstündiger Inkubation bei 37°C, Inkubation bei 4°C über Nacht und abschließender Zentrifugation bei 10 000g für 10 Minuten kein Präzipitat mehr auftrat.

### 3.7.2. Äquivalenzpunkt-Bestimmung von Vitellogenin und Anti-Vitellogenin-Serum durch quantitative Präzipitation von Antigen-Antikörper-Komplexen in Lösung

#### 3.7.2.1. Prinzip

Der Äquivalenzpunkt charakterisiert dasjenige Verhältnis von Antigen-Antikörper-Konzentrationen, bei dem maximale Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplex auftritt. Zu einer Antiserum-Verdünnungsreihe wird eine Menge an Antigen gegeben, und die Präzipitation optisch und via Proteinbestimmung quantifiziert.

#### 3.7.2.2. Durchführung

Zwei Verdünnungsreihen von 100 µl VG-spezifischen Antiserum, in 1:1 - Verdünnungsschritten und verdünnt mit PBS-Azid-Puffer, pH 7,4, wurden

einerseits mit je 1 µl gepoolter Ammen-Hämolymphe andererseits mit je 0,5 µl Hämolymphe einer eierlegenden Königin versetzt. Nachdem die Proben für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad und anschließend über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert worden waren, wurden sie zentrifugiert (5 min bei 10 000 g). Der jeweilige Überstand wurde in ein anderes Probengefäß überführt.Das Pellet wurde im Eppendorf-Gefäß unter dem Binocular auf seine Größe hin beurteilt und dann zweimal mit PBS-Azid-Puffer pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurde es mit der BRADFORD-Methode (vgl. II.3.6.1.) auf seinen Proteingehalt hin untersucht.

Alle Probengefäße mit den Überständen wurden mit jeweils 50µl Antiserum versetzt und wie vorher beschrieben erneut inkubiert. Wenn sich nach der Inkubation in einem Probengefäß noch ein Pellet bildete, so lag im Überstand ein Überschuß an Antigen vor. Aus optischer Beurteilung und Protein Bestimmung konnte der Äquivalenzpunkt für die beiden Antigenlösungen ermittelt werden. Als Kontrolle diente 100 µl Antiserum versetzt mit 30 µg BSA.

### 3.7.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese

#### 3.7.3.1. Prinzip

Mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach LAURELL (1965) wurden die Antiseren auf ihre Reinheit geprüft, indem auf die elektrophoretische Auftrennung der Ammen- und Königinnen-Hämolymphproteine in Agarose (1. Dimension) eine senkrecht dazu verlaufende Elektrophorese in ein Antikörper-haltiges Agarose-Gel folgte (2. Dimension).

#### 3.7.3.2. Durchführung

Auf Glasplatten (72 x 56 mm) wurden 6 ml 1 %iger Agarose in 0,06 M-Tris-Puffer (s. 2.2.) gegossen. Die Hämolymph-Proben wurden in ausgestanzte Löcher unter Spannung (10 V/cm Feldstärke) aufgetrgen und für 45 min bei 4°C elektrophoretisch aufgetrennt. Als Elektrophorese-Puffer diente ein 0,3 M Tris-Puffer.

Dann wurde das Gel 15 mm oberhalb des unteren Randes abgetrennt und entfernt und durch 4,0 ml 1 %iger Agarose mit 5 % Antiserum ersetzt. Die Elektrophorese in der 2. Dimension wurde danach 16 h lang bei 4°C und 2 V/cm Feldstärke durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die nichtpräzipitierten Proteine mit mehrmals gewechselter 0,9 %iger NaCl-Lösung 24 h lang ausgewaschen, die Gele gepreßt und in einem Bad mit dest. Wasser entsalzt. Dann wurden sie im Thermostaten bei 60°C getrocknet und mit einer 5 %igen Coomassie Brilliant Blue R-250-Lösung (s.a. 2.2.) für 10 min gefärbt und in einer Lösung der gleichen Zusammensetzung aber ohne Farbstoff entfärbt.

### 3.7.4. Radiale Immundiffusion

#### 3.7.4.1. Prinzip

Bei der konventionellen Form der Radialen Immundiffusion nach MANCINI (1965) wird ein Antikörper mit dem Gelträger vermischt und das Antigen in steigenden Konzentrationen in periphere Depots gefüllt. Aus dem Durchmesser der nach der Diffusion des Antigens entstandenen Präzipitationshöfe läßt sich der Antikörper-Titer quantifizieren.

Die nach den verschiedenen Antigen-Booster-Injektionen gewonnenen Kaninchenseren wurden auf diese Weise miteinander verglichen. Ein Pool von Ammenhämolymphe lieferte das Antigen.

#### 3.7.4.2. Durchführung

Auf Objektträger wurden je 3 ml 1 % iger Agarose, gelöst in 0,06 M Tris-Puffer pH 8,6 mit einem Zusatz von 0,02 % Natriumazid, gegossen, die 1 und 5 % der zu vergleichenden Antiseren enthielt. In die ausgestanzten Depotlöcher von 2 mm Durchmesser wurden 0,1, 0,5, 2 und 5 µl Hämolymphe des Pools pipettiert. Anschließend wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt. Die Gele wurden dann wie die zweidimensionale Immunelektrophorese aufgearbeitet und gefärbt.

## 3.8. Proteinsynthese-Bestimmungen in vivo

### 3.8.1. Quantitative Bestimmung der Synthese aller Hämolymphproteine

#### 3.8.1.1. Prinzip

Die Synthese aller Hämolymphproteine wurde durch Messung des Einbaus $^{3}H$-markierten Leucins in die Hämolymphproteine bestimmt, nachdem der Tracer dorso-lateral in das Hämocoel des Abdomens der Tiere injiziert worden war, und die Hämolymphe nach definierter Inkubationszeit gewonnen wurde. Dazu wurden die Hämolymphproteine mit TCA auf Filterpapier präzipitiert und die in ihnen enthaltene Radioaktivität im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.

#### 3.8.1.2. Behandlung der Versuchstiere

Die Tiere wurden auf einer Wachs-Präparierschale fixiert und mit 2 µl L-[4,5-$^{3}H$]-Leucin (AMERSHAM), spezifische Aktivität 137 Ci/mmol, Radioaktivitätskonzentration 1 mCi/ml, mit Hilfe einer 10 µl-Mikrolitерspritze (HAMILTON, 701 N) injiziert. Anschließend wurden sie im Brutschrank inkubiert: Drohnen in Gruppen zu viert mit 5 - 7 Begleitbienen, Arbeiterinnen in Gruppen zu 3 - 5 und adulte Königinen mit 3 - 4 Begleitbienen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Hämolymphe wie unter II.3.2.1. beschrieben gewonnen.

#### 3.8.1.3. Durchführung

2 x 2 µl Hämolymphe pro Tier wurden auf 1 x 1 cm große Filterpapier-Quadrate (MACHEREY & NAGEL, MN 214) pipettiert. Die Filterpapierchen waren zuvor dreimal mit Toluol und zweimal mit Ether gewaschen worden, um eine optimale Bindung der Proteine an den Träger zu gewährleisten (MURTHY und LEROUX, 1975).

Die getrockneten Filter wurden in Polypropylen-Reagenzröhrchen mit 2,5 ml eisgekühlter, 10 %iger (w/v) TCA, in der noch 10 mM kaltes Leucin gelöst worden war, für 30 min bei 4°C und 30 min bei 80°C inkubiert. Dann wurden sie noch zweimal mit TCA (10 %, w/v), zweimal mit Ethanol-Ether (1:1) und einmal mit Ether allein gewaschen. Sie wurden getrocknet und und in Szintillationsfläschchen mit 50 µl eines 9:1 Gemisches von Gewebelöser (SERVA) und aqua dest. getränkt, um die Proteine zwei Stunden lang

bei 55°C oder bei Raumtemperatur über Nacht zu hydrolysieren. Danach wurden 10 ml Szintillationscocktail und 10 µl Eisessig zur Neutralisation des Gewebelösers hinzugefügt und die geschüttelten Proben in einem Betacounter gezählt.

3.8.1.4. Kontrollen und Auswertung

Als Kontrollen dienten Versuchstiere entsprechender Entwicklungsstadien und Geschlechter, die mit 2 µl $^{3}$H-Leucin injiziert wurden, das zusätzlich noch $10^{-2}$M Cycloheximid enthielt. Damit konnte der Einbau der Radioaktivität bei gleichzeitig gehemmter Translation bestimmt werden. Das Cycloheximid mußte frisch zugegeben werden, weil es in Lösung und bei - 30°C eingefroren gelagert in wenigen Tagen seine Wirksamkeit verlor. Die bei den Kontrollen an den Filter gebundene Radioaktivität wurde als Background (vgl. II.3.8.5.) von der der Versuchstiere substrahiert.

Wenn man in Königinnen unterschiedliche Konzentrationen an $^{3}$H-Leucin zusammen mit Cycloheximid injizierte, so stieg der Background in Abhängigkeit von der injizierten Tracer-Konzentration an (Abb.2). Entsprechendes traf für Arbeiterinnen (Daten nicht gezeigt) und für Drohnen (ZILLIKENS, 1984) zu. Durch Interpolieren konnte die für einen Versuch geltende Hinter-

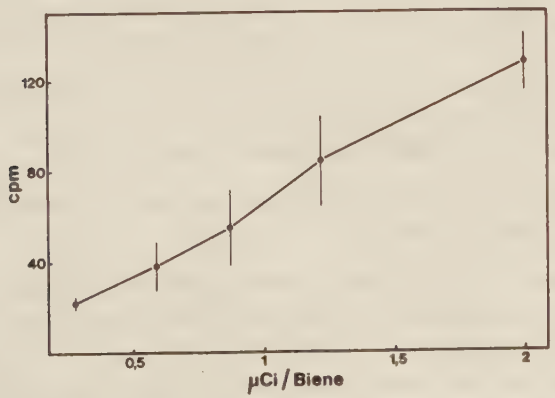



Abb. 2 Hintergrundsaktivität der TCA-Präzipitation auf Filterpapier in Abhängigkeit von der injizierten Tracer-Aktivität

Frisch geschlüpfte Königinnen wurden mit unterschiedlichen Tracer-Konzentrationen und Cycloheximid injiziert. Nach der Inkubation wurden 3 µl Hämolymphe/Filter aufgetragen. n=5

grundsaktivität nach Kenntnis der injizierten Konzentration aus der Kurve abgelesen werden. Der Background stand in linearer Beziehung zur injizierten Aktivität (r = 0,99). Außerdem war die Aktivität des Backgrounds bei drei verschiedenen untersuchten Tracer-Konzentrationen proportional zum auf den Filter pipettierten Hämolymphvolumen der Kontrolltiere (Tab.2). Die Regressions-Koeffizienten betrugen r = 0,91, 0,98 und 0,99. Das heißt, daß die injizierte Konzentration wie auch das auf den Filter applizierte Volumen bei der Korrektur der gemessenen Hämolymphproteinsynthesen um den unspezifischen Hintergrund berücksichtigt werden mußten. Filter, die ohne Hämolymphe als Leerproben gemessen wurden, ergaben die als "externer Background" bezeichnete Aktivität von 14 - 15 cpm (Tab. 2), die von externen Strahlungsquellen, z.B. Höhenstrahlung, hervorgerufen wird.

Tab. 2 Filterpapier-gebundene Radioaktivität bei Cycloheximid-behandelten geschlüpften Königinnen in Abhängigkeit von injizierter Aktivität und aufgetragenem Hämolymphvolumen. n=5/Gruppe

| injizierte Radioaktivität/Tier | Gemessene Radioaktivität (cpm) auf dem Filter bei folgenden aufgetragenen Volumina | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 3 µl | 2 µl | 1 µl | 0 µl |
| 2 µCi | 128 | 90 | 53 | 14 |
| 1,2 µCi | 84 | 61 | 38 | 15 |
| 0,87 µCi | 54 | 42 | 28 | 15 |

3.8.1.5. Vorversuche zum Hämolymphprotein-Synthese-Assay

Es wurden eine Reihe von Vorversuchen unternommen, um einige Rahmenbedingungen des Assays zu ergründen.

1. Untersuchungen, bei denen reine Tracerlösungen auf Filterpapierquadrate pipettiert wurden, ergaben, daß ein Teil der Radioaktivität an den Filter gebunden blieb, auch nachdem er gewaschen worden war. Die Bindung des $^{3}H$-Leucins an den Filter war abhängig von der applizierten Tracerkonzentration und ergab einen linearen Zusammenhang zwischen an den Filter gebundener Aktivität und der aufgetragenen Aktivitätskonzentration (r = 0,999).

| applizierte Radioaktivität (µCi/Filter) | 2 | 1,2 | 0,89 | 0,58 | 0,29 |
|---|---|---|---|---|---|
| gemessene Radioaktivität (cpm/Filter) | 1910 | 1138 | 810 | 548 | 277 |

Vermutlich rührt der bei den Cycloheximid-injizierten Bienen gemessene Background von dieser Bindung her.

2. Der Einfluß der Hämocyten auf die gemessene Aktivität wurde geprüft, indem die Inkorporation in TCA-präzipitierbare Proteine von Hämolymphpools vor und nach einer Zentrifugation bei 10 000 g für 5 min verglichen wurde. Nach der Zentrifugation war die Hämolymphe frei von Hämocyten, im Mikroskop konnten keine Zellen mehr gefunden werden. Die pelletierten Zellen konnten durch Schütteln resuspendiert werden. Dies geschah mit Hämolymphpools injizierter Königinnen und Arbeiterinnen. Wie in Tabelle 3 dargestellt, ergaben sich bei den Adulten keine deutlichen Unterschiede im Einbau der ausgefällten Proteine vor und nach der Zentrifugation. Die Differenzen sind im Wilcoxon-Test für korrelierende Stichproben als einem der schärfsten parameterfreien Tests statistisch nicht signifikant ($p = 0{,}05$).

Bei Puppen hingegen flottieren Gewebe und Zellen in der Hämolymphe, die einen beträchtlichen Anteil an präzipitierbaren, $^{3}$H-Leucin markierten Proteinen hatten (Tab. 3). Die Inkorporationen vor und nach dem Zentrifugieren unterscheiden sich im Wilcoxon-Test signifikant. Folglich wurde die Hämolymphe aller Puppenstadien vor dem Einfrieren für 10 min bei 10 000 g zentrifugiert und so von Gewebe und Zellen getrennt (vgl. auch II.3.2.1.).

Tab. 3 Einfluß der Hämocyten auf die gemessene Aktivität TCA-präzipitierbarer Proteine

| Tiere | Inkorporierte Radioaktivität in 3 µl Hämolymphe | |
|---|---|---|
| | vor der Zentrifugation | nach der Zentrifugation |
| Adulte | | |
| ♂ | 898 | 894 |
| | 1009 | 926 |
| | 653 | 668 |
| ♀ | 2802 | 2711 |
| | 2635 | 3000 |
| | 2326 | 2189 |
| | 2180 | 2314 |
| Puppen | | |
| ♀ | 457 | 387 |
| | 365 | 319 |
| | 408 | 367 |
| | 466 | 405 |

Alle Tiere wurden nach der Tracer-Injektion 3 h lang inkubiert.

3. Die Kapazität des Filters für Hämolymphe war auch beim Auftragsvolume von 9 µl noch nicht erschöpft. Zudem bestand ein linearer Zusammenhang zwischen aufgetragenem Hämolymphvolumen und im Betacounter gemessenen cpm mit dem Regressionskoeffizienten r = 0,9998 (Abb. 3).

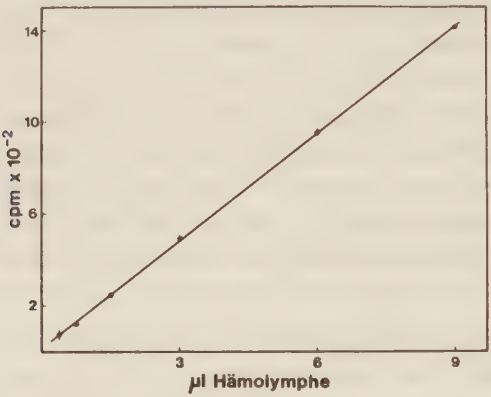



Abb. 3 Zusamenhang zwischen aufgetragenem Hämolymph-Volumen und im Hämolymphprotein-Synthese-Assay meßbaren cpm eines $^{3}$H-Leucin markierten Arbeiterinnen-Hämolymphpools. n=3

3.8.2. Quantitative Bestimmung der Vitellogenin-Synthese via indirekter immunopräzipitation mit Protein A

3.8.2.1. Prinzip

Bei der indirekten Immunopräzipitation mit Protein A (KESSLER, 1975) wird zuerst mit einem spezifischen Antikörper das gewünschte Antigen gebunden. Die sich bildenden Antigen-Antikörper-Komplexe bleiben in Lösung, weil der Antikörper im Überschuß zugegeben wird.

Das Protein A, ein Zellwandprotein der meisten Staphylococcus aureus-Stämme, mit einem Molekulargewicht von 42 000, besitzt vier nahezu homologe Regionen, die den $F_C$-Teil vieler Säuger-Immunglobuline binden, insbesondere die Klasse G. Fixiert in den Membranen abgetöteter Staphylococcus aureus-Bakterien wird es zu der Lösung gegeben, die die Antigen-Antikörper-Komplexe enthält, so daß die Komplexe wie auch freies Immunglobulin G an die Membranen binden und so durch Zentrifugation isoliert werden können. Die Bindungsaffinität von Protein A für Antigen-Antikörper-Komplexe ist 20 - 30 mal größer als die für ungebundenes Immunglobulin.

Auf diese Weise wurde auch radioaktiv markiertes Vitellogenin mit dem Vitellogenin-spezifischen Antikörper (vgl. II.3.7.) und Protein A isoliert und seine Aktivität im Szintillationszähler bestimmt.

3.8.2.2. Gewinnung von Protein A

1. Vorkultur

Der bei - 70°C aufbewahrte humanpathogene (!) Staphylococcus aureus-Cowan I-Referenzstamm (0,5 ml 60 % Glyzerin, 1 ml Bakteriensuspension) - ein Geschenk von Herrn PD. Dr. Handtke, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, Universität Tübingen - wurde auf einer Tryptone-Yeast-Vollmedium-Agarplatte (DIFCO) ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert.

Ein einzelner Klon wurde daraufhin in 10 ml der folgenden Nährlösung steril übertragen und 8 - 12 h in einem Erlenmeyer-Kolben mit Schickanen bei 37°C im temperierten Schüttler inkubiert. Die Suspension diente als Inoculum für die Hauptkultur.

Zusammensetzung und Herstellung der Nährlösung (KESSLER, 1981):

| | |
|---|---|
| Penassay Broth (DIFCO) | 17,5 g/l |
| Casitone (DIFCO) | 10,0 g/l |
| Hefeextrakt | 2,5 g/l |
| Glyzerophosphat | 5,0 g/l |
| Niacin | 4,0 mg/l |
| Thiamin-HCl | 2,0 mg/l |

Die Nährlösung wurde ohne Vitamine autoklaviert, die Vitamine wurden stattdessen sterilfiltriert und dann zum autoklavierten Medium gegeben.

2. Hauptkultur

Die Vorkultur wurde steril in 1 l der Nährlösung, als dem Hauptkultur-Medium gegeben und dann bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Bakterienkultur wurde nach 12 h Inkubationszeit stündlich mit Absorptionsmessungen bei 525 nm verfolgt. Sobald die stationäre Phase des Bakterienwachstums erreicht war, wurde die Inkubation abgebrochen, da bei längerer Inkubation in der Stationärphase ein signifikanter Verlust an Protein A auftritt (KESSLER, 1981).

3. Ernte

Die Bakterienkultur wurde dann in verschließbare 25o ml Polycarbonat-Zentrifugenflaschen aufgeteilt und 5 min bei 7 000 Upm zentrifugiert. Generell empfiehlt sich, die kleinste Zentrifugalbeschleunigung, die das Pelletieren der Zellen erlaubt, anzuwenden, weil sich die Zellen dann leichter resuspendieren lassen. Der Überstand wurde dekantiert (autoklavieren!) und die Zellen schonend mit einer weitlumigen Glaspipette in PBS-Azid-Puffer (II.2.2.) resuspendiert und zweimal gewaschen.

Nach dem zweiten Waschen wurden die Zellen vereinigt und die Ausbeute durch Wiegen des Pellets bestimmt. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS-Azid, das 1,5 % Formaldehyd enthielt, als 10 %ige Lösung (w/v) resuspendiert und 90 min lang mit einem Magnetrührstab gerührt, um die meisten Bakterien abzutöten und deren Zellwände zu stabilisieren.

Danach wurden die Zellen zentrifugiert und zügig in PBS-Azid aufgenommen Die Suspension wurde in einen Erlenmeyer-Kolben (2 l) übertragen, in einem Wasserbad von 80$^{o}$C 5 min lang schnell und kontinuierlich geschüttelt und dann auf Raumtemperatur gebracht, indem der Kolben in einem Eisbad schnell geschüttelt wurde, um ein Verklumpen der Zellen zu verhindern. Damit waren die Bakterien abgetötet und ihre autolytischen Enzyme inaktiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Azid und Einstellen auf eine 10%-ige Suspension wurden die Bakterien schockgefroren und bei - 70$^{o}$ C gelagert. Bei 4$^{o}$C sind die Zellen nur 2 Monate haltbar (KESSLER, 1981).

3.8.2.3. Präparation des bakteriellen Adsorbens

Die für den jeweiligen Versuch benötigte Menge an Zellen wurde aus der Stammlösung entnommen und 15 min bei 3 000 g zentrifugiert (KESSLER, 1981). Das Pellet wurde im 5-fachen Volumen der Ausgangs-Lösung mit 0,5% NP40-NET-Puffer (s. II.2.2.) resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen 6 min bei 3 000 g zentrifugiert und das Pellet einmal mit 0,05 % NP 40-NET-Puffer gewaschen, ehe die Suspension wieder auf ihre ursprüngliche 10 %ige (w/v) Konzentration mit 0,05% NP40-NET-Puffer, dem 1 mg/ml BSA, 1 mM PMSF und 2 mM Leucin zugesetzt worden waren, eingestellt wurde.

3.8.2.4. Indirekte Immunopräzipitation mit Protein A

Jede Probe wurde in 0,5 ml 0,05 % NP40-NET-Puffer mit den o.g. Zusätzen pipettiert. Alle Proben, sowie die eingesetzten Antiseren wurden dann 30 min lang in der Ultrazentrifuge bei 110 000 g (4°C) zentrifugiert, um störende Aggregate zu entfernen.

Der Überstand der Proben wurde in zwei Aliquoten aufgeteilt und mit je 250 µl aufgefüllt. Zur einen Hälfte der Proben wurden 100 µl des Vitellogenin-spezifischen Antiserums (s.a. II.3.8.2.5.) pipettiert, zu den Parallelproben als Kontrolle 100 µl eines Hyperimmunserums ohne spezifische Antikörper gegen Vitellogenin. Alle Proben wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur (KESSLER, 1981) unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurden 150 µl (vgl. II.3.8.2.5.) des vorbereiteten bakteriellen Adsorbens zu allen Proben pipettiert, geschüttelt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Zeitraum ist die maximale Bindung des Immunglobulins an Protein A erreicht (NATALI et al., 1979, zit. nach MACSWEEN and EASTWOOD, 1981).

Die Proben wurden 30 sec bei 10 000 g (BECKMAN Microfuge) zentrifugiert der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 300 µl 0,05 % NP40-NET-Puffer auf dem Schüttler resuspendiert. Viermaliges Waschen des Pellets war erforderlich (vgl. II.3.8.2.5.).

Nach dem letzten Waschen wurden die Pellets mit 150 µl Gewebelöser (SERVA) versetzt und solange bei 55°C inkubiert (≥ 2 h), bis das Pellet vollständig aufgelöst war. Diese Lösung wurde in Szintillationsfläschchen übertragen, das Probengefäß einmal mit 50 µl Gewebelöser gespült, der Gewebelöser mit 30 µl Eisessig neutralisiert, schließlich 10 µl Szintillationscocktail hinzugefügt, und die Aktivität im Betacounter gemessen. Die Vitellogenin-Synthese wurde durch Subtraktion der Aktivität der jeweiligen Kontrollprobe von der Probe mit Vitellogenin-spezifischem Antikörper errechnet.

3.8.2.5. Entwicklung optimaler Bedingungen des Vitellogenin-Radioimmunassays

Mit dem spezifischen Antikörper gegen Vitellogenin (3.7.1.) und der indirekten Immunopräzipitation mit Protein A wurde ein RIA entwickelt, der die Bestimmung der Vitellogenin-Synthese von Hämolymphproben ermöglicht.

Die indirekte Immunopräzipitation setzt aber voraus, daß einerseits bei der Antigen-Antikörper-Reaktion der Antikörper im Überschuß vorliegt und andererseits bei der Bindung der Immunglobuline an das Protein A das letztere im Überschuß vorliegt, damit das Antigen vollständig gebunden wird (KESSLER, 1975; 1981). Deshalb waren Studien zur Bindungskapazität von Antiserum und Protein A erforderlich.

1. Bestimmung der Bindungskapazität des Protein A

Die Bestimmung der Bindungskapazität des Proteins A setzte voraus, daß der Äquivalenzpunkt zwischen Vitellogenin und Anti-Vitellogenin-Serum (vgl. 3.7.2.) bekannt war. Dieser wurde für Ammenbienen und eierlegende Königinnen bestimmt und betrug größenordnungsmäßig 20 µl Antiserum pro µl Ammenhämolymphe und 100 µl Antiserum pro µl Königinnen-Hämolymphe. Für die Protein A-Bindungsstudie wurden deshalb je 0,33 µl Königinnen-Hämolymphe von 100 µl Antiserum ( = Überschuß) und zunehmenden Mengen an Protein A-Suspension versetzt . Schon ein µl der Protein A-Suspension band 63% der radioaktiv markierten Antigen-Antikörper-Komplexe, und bei 50 µl eingesetzter Bakteriensuspension waren alle Komplexe gebunden (Abb. 4). Aus diesem Experiment wurde abgeleitet, daß bei der Verwendung von 150 µ Protein A-Lösung pro 100 µl Antiserum der erforderliche Überschuß an Bindungsstellen für die Immunglobuline gegeben ist.

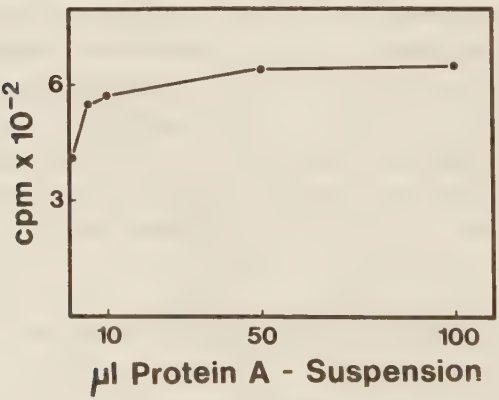



Abb. 4 Bindungskapazität von Protein A für das Vitellogenin-spezifische Antiserum

Je 100 µl Antiserum mit gebundenem $^{3}$H-markiertem Vitellogenin werden mit steigenden Volumina an Protein A-Suspension versetzt und die gebundene Radioaktivität gemessen.

2. Bestimmung der Bindungskapazität des Vitellogenin-spezifischen Antiserums

Um die Bindungskapazität des Antiserums in diesem Assay herauszufinden, wurde Hämolymphe eierlegender Königinnen in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 verdünnt und die jeweiligen Verdünnungsstufen mit 100 µl des Antiserums inkubiert. Die Radioaktivität im Vitellogenin-RIA wurde gemessen (Abb. 5, Tab. 4). Die Bindungsstellen des Antiserums waren schon bei 0,57 µl Hämolymphe abgesättigt. Größere Antigenmengen steigerten nicht die gebundene Radioaktivität, während die gemessene Radioaktivität von Hämolymphvolumina unterhalb von 0,3 µl proportional zum Hämolymphvolumen war. Zudem war die Radioaktivität der Kontrollen proportional zum untersuchten Hämolymphvolumen (r = 0,999).

Tab. 4 Bindungskapazität des Vitellogenin-spezifischen Antiserums für Hämolymphe eierlegender Bienenköniginnen [1]

| Hämolymphvolumen (µl) | Gebundene Radioaktivität (cpm) VG-spezifisches Antiserum * | Nicht-VG-spezifisches Hyperimmunserum |
|---|---|---|
| 2,26 | 1708 | 98 |
| 1,13 | 1750 | 59 |
| 0,565 | 1707 | 39 |
| 0,226 | 1084 | 28 |
| 0,113 | 528 | 24 |
| 0,0565 | 260 | – |
| 0,0226 | 100 | – |

* Die unspezifische gebundene Aktivität ist subtrahiert.

[1] Die radioaktiv markierte Hämolymphe (3 h Inkubation) wurde verdünnt und jede Verdünnungsstufe mit 100 µl Antiserum versetzt.

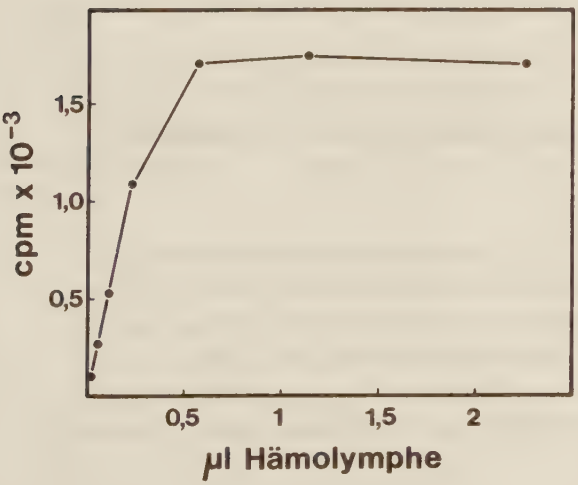



Abb. 5

Bindungskapazität des Vitellogenin-spezifischen Antiserums für Hämolymphe eierlegender Bienenköniginnen. Leg. s. Tab. 4

Bleibt abschließend noch zu erwähnen, daß diese Bindungsstudien für jede neue Charge geernteter Protein A-Kultur und für jede neue Antiseren-Charge erforderlich sind. Parallele Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit des Antiserums für Arbeiterinnen-Hämolymphe ergaben, daß das markierte Vitellogenin von mehr als 1 µl Ammen-Hämolymphe vollständig im RIA gebunden wurde (Daten nicht dargestellt).

Begleitend wurde noch untersucht, wie oft das Vitellogenin-Anti-Vitellogenin-Protein A-Pellet gewaschen werden mußte, ehe keine ungebundene Radioaktivität im Überstand mehr meßbar war. Radioaktivitäts-Messungen von Aliquoten des Überstands und seiner TCA-präzipitierbaren Proteine ergaben, daß nach viermaligem Waschen keine ungebundenen markierten Verunreinigungen mehr vorkamen (Abb. 6).

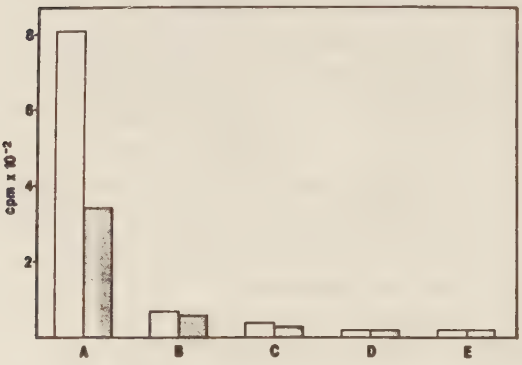



Abb. 6

Effektivität der Waschvorgäng
im Vitellogenin-RIA

Aliquoten der Überstände wurde
vor dem ersten und nach jede
weiteren Waschen des Pellets a
$^{3}$H-Vitellogenin, Anti-Vitellogen
und Protein A auf Gesamt- (weiß
Säulen) und TCA-präzipitierba
(graue Säulen) überprüft. n=
Königinnen-Hämolymphe als Prob

A: Nach der Zentrifugation, vo
dem 1. Waschvorgang
B: Nach dem 1. (C: 2.; D: 3.; E:
Waschvorgang

3.8.3. Bestimmung der Synthese einzelner Proteine via Fluorographie

3.8.3.1. Prinzip

Tritium-markierte Proteine, die in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt wurden, können durch die Schwärzung eines direkt auf ein getrocknetes Gel gelegten Röntgenfilms sichtbar gemacht werden: Das Gel wird vor seiner Exposition mit Szintillatoren imprägniert, die auf die Anregung durch die von Tritium emittierten ß-Teilchen Lichtblitze aussenden (BONNER und LASKEY, 1974). Die dadurch hervorgerufene Schwärzung

entspricht innerhalb bestimmter Grenzen der Radioaktivität der Bande. Dies trifft auch für Hämolymph-Proteine von Bienen zu (ZILLIKENS, 1984).

3.8.3.2. Färbung und Vorbereitung der Polyacrylamid-Gele

Nach der Elektrophorese (vgl. II.3.6.2.) wurde das Gel mit Kenacid Blue R (s. II.2.2.) statt mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt, weil ersteres einen deutlich geringeren Quench verursacht (HARDING und SCOTT, 1983). Sie wurden photographiert, sobald der Hintergrund entfärbt war. Um den Quench gering zu halten, wurde das Gel möglichst vollständig entfärbt und daraufhin für 30 min mit einer Szintillator-haltigen Lösung (Amplify, AMERSHAM) imprägniert. Dann wurde es auf einen Filterpapierträger (MACHEREY & NAGEL MN 214) plaziert und im Geltrockner (LKB) unter Vakuum getrocknet.

3.8.3.3. Exposition

Ein Röntgenfilm (AGFA Curix RP 18 x 24) wurde mit einem abgeschwächten Lichtblitz vorbelichtet, damit der Film für die emittierten Lichtblitze sensitiver und die Schwärzung quantifizierbar wird (LASKEY und MILLS, 1975). Dann wurde er auf das getrocknete Gel gelegt, und beide zwischen Glasplatten geklemmt, um einen engen Kontakt zwischen Gel und Film zu gewährleisten. Alles zusammen wurde mit Alufolie, schwarzer Folie und Filmkarton lichtundurchlässig und für 2 - 13 Wochen ein- oder mehrfach bei - 70°C exponiert.

3.8.3.4. Photograpie und Scannen der Fluorographien

Die entwickelten Fluorographien wurden mit einem KODAK Technical Pan 2415 Film photographiert und mit einem Photometer (Chromoscan 200, Scan 201, JOYCE-LOEBL) bei 530 nm densitometrisch ausgewertet. Als Nullwert wurde die Extinktion des Films neben den aufgetrennten Proben eingestellt.

## 3.9. Methoden der in vitro-Kultur von Organen der Honigbiene

### 3.9.1. Zusammensetzung des Kulturmediums

Wie in der Einleitung dargelegt, erschien es notwendig, ein Kulturmedium speziell für Honigbienen zu entwickeln. Seine Komponenten wurden in vier Gruppen unterteilt: Aminosäuren, anorganische Salze, Zucker und zusätzliche Additive (Tab. 5).

Die Aminosäure-Zusammensetzung stützte sich auf die Untersuchungen von WANG und MOELLER (1970) an 10 Tage alten Arbeiterinnen. Ergebnisse über das Kationen-Muster der Honigbienen-Hämolymphe (FLORKIN und JEUNIAUX, 1963; SIDIE, 1977) dienten dazu, die anorganischen Salze zusammenzustellen. Das $Na^+/K^+$- und das $Mg^{2+}/Ca^{2+}$-Verhältnis des Mediums stimmt mit dem der veröffentlichten Konzentrationen überein (FLORKIN und JEUNIAUX, 1963).

Adulte Honigbienen enthalten höhere Zuckerkonzentrationen in ihrer Hämolymphe als andere Insekten (CZARNOWSKI, 1954; FLORKIN und JEUNIAUX, 1963; ALUMOT und LENSKY, 1969; BOUNIAS, 1978). Größenordnungsmäßig entsprechende Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose wurden im Medium gelöst, zumal Glucose und Fructose essentielle Wachstumsfaktoren in in vitro-Kulturen von Insekten-Zellen und -Geweben sind (HINK, 1972). Auf die für Insekten typische Trehalose (FLORKIN und JEUNIAUX, 1974) wurde verzichtet, da sie vom Fettkörper aus Vorstufen selbst gebildet wird (WYATT, 1967).

Als zusätzliche Komponenten wurden die Puffersubstanz PIPES, Antibiotika und BSA hinzugefügt. BSA sollte in der Konzentration von 5 g/100 ml Medium die Proteine der Hämolymphe ersetzen, deren Konzentration bei adulten Königinnen zwischen 50,4 und 60,8 mg/ml beträgt (KAATZ, 1980). Diese Konzentration entspricht den für Arbeiterinnen veröffentlichten Daten (RUTZ et al., 1976).

Der pH 6,70 des Mediums entspricht dem der Hämolymphe adulter Arbeiterinnen (HOSKINS und HARRISON, 1934). Die Osmolarität der Hämolymphe adulter Bienenköniginnen beträgt 538 mOsm/l (VERMA, 1973) und die adulter Arbeiterinnen 490 - 505 mOsm/l (SIDIE, 1978). Da die optimale Osmolarität, um inkubierte Bienenaugen zu untersuchen, bei 520 mOsm/l lag (GRUNDLER, 1975), wurde die Osmolarität des Mediums auf 500 mOsm/l eingestellt und mit einem Gefrierpunktsosmometer (KNICK) kontrolliert.

Tab. 5

Zusammensetzung des Honigbienen-Mediums

| Komponenten | Konzentration mg/100 ml | mM |
|---|---|---|
| **Aminosäuren** | | |
| L-Ala | 30 | 3,36 |
| L-Arg | 50 | 2,92 |
| L-Asn | 20 | 1,51 |
| L-Asp | 10 | 0,75 |
| L-Cys | 5 | 0,21 |
| L-Glu | 25 | 1,70 |
| L-Gln | 100 | 6,84 |
| L-Gly | 20 | 2,66 |
| L-His | 20 | 1,30 |
| L-Ile | 10 | 0,76 |
| L-Lys | 55 | 3,76 |
| L-Met | 5 | 0,34 |
| L-Phe | 10 | 0,61 |
| L-Pro | 330 | 28,67 |
| DL-Ser | 20 | 1,90 |
| L-Thr | 15 | 1,26 |
| L-Trp | 5 | 0,25 |
| L-Tyr | 10 | 0,55 |
| L-Val | 15 | 1,28 |
| **Anorganische Salze** | | |
| NaCl | 158 | 27,00 |
| KCl | 179 | 24,00 |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 40,6 | 2,00 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 49,3 | 2,00 |
| $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | 69 | 5,00 |
| $NaHCO_3$ | 33,6 | 4,00 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 102,9 | 7,00 |
| **Zucker** | | |
| Glucose | 400 | 22,00 |
| Fructose | 250 | 13,88 |
| Sucrose | 5537 | 170,90 |
| **Zusätzliche Komponenten** | | |
| Penicillin G | 15 | 0,40 |
| Streptomycin | 25 | 0,12 |
| PIPES | 756 | 25,00 |
| BSA | 5000 | 0,00074 |

### 3.9.2. Mediumherstellung

Jedesmal wurden 100 ml Medium hergestellt und die Komponenten in entsprechenden Mengen abgewogen. PIPES und die anorganischen Salze bis auf $CaCl_2$ wurden in 20 ml, die Aminosäuren gesondert in 50 ml und die Zucker in 15 ml aqua bidest gelöst. Das $CaCl_2$ wurde zur Aminosäurelösung hinzugefügt. Dann wurden Zuckerlösung und anorganische Salzlösung miteinander vermischt und der pH auf 6,70 eingestellt - ebenso wie bei der Aminosäurelösung. Daraufhin wurden die Lösungen vereinigt. Schließlich wurden BSA und Antibiotika addiert, der pH kontrolliert und das Medium auf das Endvolumen von 100 ml eingestellt. Dann wurde es mit Membranfiltern (MILLIPORE Millex-GS, 0,22 µm; später Sterivex-GS) sterilfiltriert, und in sterilen Kulturfläschchen im Kühlschrank bei $4^{o}C$ aufbewahrt.

Die Medien wurden möglichst frisch verwendet. Medien, die älter als zwei Monate sind, sollten nicht mehr eingesetzt werden, denn es hatte sich in einem Experiment herausgestellt, daß ein sechs Monate altes Medium für die Fettkörper toxisch war. Zudem verliert das Streptomycin-Sulfat an Wirksamkeit, weil es in wässriger Lösung instabil ist (RIDDIFORD et al., 1979).

### 3.9.3. Weitere verwendete Kulturmedien

Zum Vergleich wurden Medien herangezogen, die u.a. für die in vitro-Kultur von Lepidopteren- (GRACE, 1962) und Dipteren-Geweben (BOHM et al., 1978) dienten. Sie wurden entsprechend ihrer ursprünglichen Formulierung mit folgenden Modifikationen hergestellt: Leucin wurde ausgeschlossen, 5 g BSA/100 ml Medium hinzugefügt, der pH auf 6,70 und die Osmolarität auf 500 mOsm/l mit Saccharose eingestellt. BLOMQUIST et al. (1980) entwikkelten eine Saline zur Inkubation von Wachsdrüsen der Honigbiene in vitro, zu der Zucker, Aminosäuren, BSA und Antibiotika entsprechend der Honigbienen-Zusammensetzung gefügt wurden. Alle Medien wurden sterilfiltriert.

### 3.9.4. Präparationsverfahren

Adulte Arbeiterinnen, 6-8 d alt, stammten von Brutwaben von Bienenvölkern die im Labor oder in deren Nähe standen, um die Zeit zwischen Entnahme aus dem Volk und ihrer Präparation möglichst gering zu halten. Sie wurden kurz unter $N_2$-Narkose immobilisiert und unter einer reinen Werkbank (EHRET) präpariert: Das Abdomen wurde isoliert und seine letzten beiden

Segmente vorsichtig abgezogen. Dabei wurden zugleich Stachelapparat, Darm und die Malphigischen Gefäße mit entfernt. Dann wurde das Abdomen mit einer feinen Augenschere entlang der Pleuralnaht in dorsale und ventrale Hälfte geteilt. Letztere wurde nicht weiter verwendet (vgl. III.8.1.1.). Der Fettkörper der Honigbiene besteht aus Zellagen, die der Cuticula anliegen. Somit kann er nicht isoliert werden, ohne daß größere Zerstörungen des Gewebes in Kauf genommen werden müssten. Deshalb wurden ganze dorsale Abdminalkarkassen in vitro inkubiert. In diesen Karkassen verblieb neben dem Fettkörper und wenig Muskulatur auch das dorsale Herzgefäß, das durch seine steten Kontraktionen für zusätzliche Zirkulation des Mediums sorgte.

Die Präparation der Fettkörper von Königinnen geschah in der Weise wie bei Arbeiterinnen. Wesentlicher Unterschied war, daß - nachdem die ventrale Hälfte des Abdomens entfernt worden war - zuerst die Ovarien mit einer Pinzette caudal aus dem Abdomen entnommen wurden, ohne die Tracheen, die Herzgefäß und Fettkörper versorgen, zu zerstören.

### 3.9.5. Organkultur

Die Organe wurden sofort nach der Präparation in vertiefte Objektträger plaziert und mit Medium versehen. Sowohl bei den Fettkörper- wie auch den Ovarpräparationen wurden die beiden abdominalen Traccheensäcke so geöffnet, daß ihr Epithel auf der Oberfläche des Mediums schwimmen konnte. Dadurch standen die Gewebe über das zur Medienoberfläche hin offene Tracheen-System mit der Umgebungsluft in Verbindung. Die Organe wurden dann mehrfach mit PTU-haltigem Medium (2,5 mg/100ml) gewaschen, um die Melanisierung zu hemmen. Danach wurden sie in speziell entwickelte runde Glas-Inkubationsgefäße überführt und zweimal mit PTU-freiem Medium gewaschen.

Fettkörper-Präparationen von Arbeiterinnen wurden paarweise, Fettkörper-Präparationen und Ovarien von Königinnen einzeln zuerst für je nach Fragestellung unterschiedliche Perioden im Medium, das 0,758 mM unmarkiertes Leucin enthielt, vorinkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und durch eines ersetzt, das L-[4,5-$^{3}$H]Leucin (AMERSHAM, 147 Ci/mmol, 25 $\mu$Ci/ml Medium) enthielt. Vorinkubation und Inkubation erfolgten innerhalb einer doppelten feuchten Kammer auf einer rotierenden Platte (40 Upm) in einem Thermostaten bei 34,5$^{o}$C. Die Präparationen wurden in folgenden Volumina inkubiert:

- Arbeiterinnen-Fettkörper zuerst in 150 µl, später in 120 µl und schließlich in 100 µl. Die Inkubationsvolumina wurden deshalb reduziert, weil ein hoher Medienspiegel im Inkubationsgefäß z.T. das Abreißen der Tracheenverbindungen mit den Organen verursachte.
- Königinnen-Fettkörper in 100 µl und
- Ovarien in 120 µl Kulturmedium

3.9.6. Bestimmung von Protein- und Vitellogenin-Synthese in vitro

In vielen Fällen wurde die Inkubation durch Tiefgefrieren von Organen und Medium beendet. Die Organe wurden dann im Medium zusammen mit 0,2 µl PBS pH 6,7 + 10mM Leucin (vgl. II.2.2.) in einem 1 ml Duall-Homogenisator (WHEATON) homogenisiert und bei 12 500 g 10 min lang zentrifugiert. Die Inkorporation des $^{3}$H-Leucins in wasserlösliche Proteine wurde durch TCA-Präzipitation des Überstandes auf 2 x 2 cm großen Filterpapierquadraten (wie unter 3.6. beschrieben) bestimmt.

Als Kontrollen wurden Organe mit Medium, das $10^{-3}$M Cycloheximid enthielt vorinkubiert und mit Medium inkubiert, das außer mit $^{3}$H-Leucin noch mit $10^{-3}$M Cycloheximid versetzt worden war. Sie wurden dann, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und der Mittelwert der gemessenen Aktivitäten, die vor allem durch die unspezifische Bindung des Tracers an den Filter bedingt ist (vgl. II.3.6.1.), von der Aktivität der Proben subtrahiert. In den die in vitro-Experimente betreffenden Abbildungen ist jeweils die Nettoinkorporation wiedergegeben.

Die Zählausbeute der Filterpapiermethode wurde durch Quenchkorrektur ermittelt und betrug 47,2%. Sie wurde einerseits mit der externen Standard-Methode via Bestimmung der Compton-Elektronen (DE WACHTER und FIERS, 1967) und andererseits mit der "Interne-Standard"-Methode bestimmt, die als genaueste Methode gilt (ROGERS und MORAN, 1966).

Die Vitellogeninsynthese wurde auf die unter II.3.7.4. beschriebene Weise im Überstand der Homogenate bestimmt. Der Äquivalenzpunkt (vgl. II.3.7.2.) von Fettkörper-Homogenaten eierlegender Königinnen beträgt 10 µl Überstand pro 50 µl Antiserum, und der von Ovarhomogenaten 4 µl/50 µl Antiserum.

Bei Experimenten mit Königinnen wurden Medien und Organe teilweise auch getrennt auf Protein- und Vitellogenin-Synthese hin untersucht. Dazu wurde das Medium nach der Inkubation abgesaugt, die Organe einmal mit Medium gespült und schließlich bis zur Aufarbeitung tiefgefroren.

Alle Experimente, die der Entwicklung des in vitro-Systems galten, wurden an Arbeiterinnen vorgenommen. Erst nach dem es optimiert worden war, wurde es für Königinnen adaptiert.

### 3.9.7. Inkubation der Organe mit Juvenilhormon, Ecdysteron, Hämolymphe und Kopfextrakten

Fettkörper und teilweise auch Ovarien wurden zusammen mit verschiedenen Faktoren inkubiert und ihre Protein- und Vitellogeninsynthese ermittelt.

Juvenilhormon, bis zur Grenze seiner Löslichkeit in wässrigen Lösungen (GIESE et al., 1977), und Ecdysteron in Konzentrationen, die im Bereich der bei Bienen vorkommenden Molaritäten lagen, wurden in Medium gelöst und die Organe darin vorinkubiert und inkubiert.

Hämolymphe, die den Bienen direkt vor der Präparation für die in vitro-Kultur entnommen worden war, wurde gepoolt, und dem Medium 10 %ig zugesetzt, nachdem sie für 1 bzw. 10 min bei 60°C im Wasserbad erwärmt worden war, dann sofort auf 0°C gekühlt und 10' bei 10 000 g in der Kälte zentrifugiert worden war. Durch diese Behandlung wurde die Polyphenoloxidase inaktiviert (WYATT, 1956), und die Melanisierung des Kulturmediums und damit auch toxische Effekte (MAZZONE, 1976) verhindert.

Köpfe wurden nach dem Prinzip "freeze and thaw" grob extrahiert, indem sie an ihrer Rückseite aufpräpariert wurden und in Medium 5 x schockgefroren und wieder aufgetaut wurden. Die Köpfe wurden daraufhin aus dem Medium genommen und die Fettkörper darin inkubiert. Als Kontrollen dienten Extrakte von Drohnenköpfen.

## 3.10. Allgemeines zu den Abbildungen

Die senkrechten Balken in den Diagrammen repräsentieren - wenn nicht anders angegeben - die Standardabweichung des Mittelwertes.

III. Ergebnisse

## 1. Bestimmung und Charakterisierung von Entwicklungsstadien in der Königinnen-Entwicklung.

### 1.1. Entwicklungsdauer

Die Bestimmung und Charakterisierung der Entwicklungsstadien erfolgte auf die unter II.3.1. beschriebene Weise. Zuerst wurden Rahmendaten aus der Analyse der Entwicklung von 76 Königinnen gewonnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Entwicklung der Königin vom Ei bis zur geschlüpften Imago dauerte im Durchschnitt 15 Tage und 8 Stunden. Als erstaunlich konstant stellte sich die Dauer von der Puppenhäutung bis zur Imaginalhäutung mit 112 + 2 h und ihre beobachtete maximale Variation von 6,5 h heraus wenn man die für die Gesamtentwicklung beobachtete Variation von 31,5 h damit vergleicht. Diese Daten stimmten größenordnungsmäßig mit denen von JAY (1963) überein, der für die Puppenentwicklung eine mittlere Dauer von 117 + 3 h gemessen hatte. Aus diesen Übereinstimmungen leitete ich ab, daß in meinen Versuchsreihen keine abnormen Aufzuchtbedingungen für die Königinnen herrschten. Daher konnte die Puppenentwicklung unbesorgt eingehender untersucht werden.

### 1.2. Puppenentwicklung

Nach der im Laufe der Puppenentwicklung sich ändernden Pigmentierung von Augen und Thorax wurden 15 Altersstadien definiert und ihre durchschnittliche Dauer erfaßt. Dabei stellte sich heraus, daß die Imaginalhäutung nie länger als 30 Minuten dauerte und somit die kürzeste Phase in der Ontogenese der Puppen darstellte. Alle Daten der Puppenentwicklung wurden daher auf auf dieses Entwicklungsereignis bezogen. Die an 141 Königinnenpuppen gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tab. 6 Entwicklungszeiten in der Ontogenese der Bienenkönigin n = 76

| | Entwicklungsdauer | | | |
|---|---|---|---|---|
| von bis | $\bar{x}$ | s | kürzeste | längste |
| Ei - Schlupf aus der Zelle | 15 d, 8 h | 6,5 h | 14 d, 16 h | 15 d, 23,5 h |
| Puppenhäutung - Imaginalhäutung | 112 h | 2 h | 109,75 h | 116,25 h |
| Imaginalhäutung - Schlupf a. d. Zelle | 9,5 h | 1 h | 7,75 h | 10,75 h |

Tab. 7 Charakterisierung pupaler Entwicklungsstadien von Bienenköniginnen [1]

| Stadium | Charakteristika | | | Entwicklungsdauer (h) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Augenfarbe | Thoraxpigmentierung | Besonderheiten | Dauer bis zur Imaginalhäutung mittlere Dauer $\bar{x}$ | s | kürzeste | längste | Durchschnittliche Dauer der Phase |
| Puppenhäutung | | | | 112 | 2 | 109,75 | 116,25 | |
| P 1 | perlweiß (1013) | perlweiß (1013) | | 101 | 11 | 89 | 116 | 22 |
| P 2 | hellrosa (3015) | perlweiß (1013) | | 85 | 2 | 82 | 90 | 4 |
| P 3 | beigerot (3012) | perlweiß (1013) | | 81 | 2 | 78 | 84 | 3 |
| P 4 | rotviolett (4002) | perlweiß (1013) | | 70,5 | 2,5 | 66 | 74 | 6 |
| P 5 | Bordeauxviolett (4004) | perlweiß (1013) | | 64 | 3 | 60,5 | 67 | 4 |
| P 6 | rotlila (4001) | perlweiß (1013) | | 56 | 3 | 50 | 62 | 8 |
| P 7 | | | Beginn der orangebraun-Färbung an den anterioren Ecken der Mesoscutumränder | 49 | 2 | 46 | 52 | |
| P 8 | | hellelfenbein (1015) | Ränder des Mesoscutums vollständig orangebraun (8023) | 38 | 2 | 35 | 42 | |
| P 9 | | elfenbein (1014) | | 37 | 4,5 | 31 | 42 | 7 |
| P 10 | | beige (1001) | | 26 | 3 | 21 | 30,5 | 5 |
| P 11 | | braunbeige (1011) | | 21 | 2,5 | 18 | 25 | 3 |
| P 12 | | khakigrau (7008) | | 10,5 | 1,5 | 8,25 | 14,5 | 4 |
| P 13 | schokoladenbraun (8017) | | | 7,5 | 1 | 0 | 8,5 | 7,5 |
| P 14 | schokoladenbraun (8017) | sepiabraun (8014) | | 5 | 1,5 | 2 | 7,5 | 3 |
| P 15 | schokoladenbraun (8017) | schwarzbraun (8022) | | 1,5 | 0,25 | 0 | 1,75 | 1,5 |

[1] n = 141, ( ) = RAL-Farbenbezeichnung (RAL, 1976)

## 2. Untersuchungen zum Endocrinum der Honigbiene

### 2.1. Juvenilhormon

#### 2.1.1. Spezifische Aktivität des Juvenilhormons III im Galleria-Wachs-Test

Damit die Aktivitäten von Hämolymphextrakten im Galleria-Wachs-Test (vgl. II.3.4.1.) in Juvenilhormon-Konzentrationen transformiert werden konnten, wurden zuerst 5µg eines frischen JH-Standards in 200 µl Paraffinöl gelöst und verdünnt (vgl. II.3.4.1.3.). Die Verdünnungen wurden im Galleria-Test auf ihre JH-Aktivität hin getestet. Die Operationsergebnisse in % positiver Reaktion bei gegebenen JH-Konzentrationen im Paraffin sind in Abb. 7 dargestellt. Eine mit JH-freiem Paraffin behandelte Kontrollgruppe wurde parallel zur Eichkurve analysiert und ergab ausschließlich negative Reaktionen. Aus der Kurvenanpassung von Prozenten positiver Reaktion mit der logarithmischen linear transformierten Regression - zwischen der letzten Verdünnungsstufe mit 100 % positiver Reaktion und der ersten Verdünnungsstufe mit 0 % positiver Reaktion - und der zugehörigen JH-Konzentration wurde der 50 %-Wert (1 GU) errechnet.Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden betrug r = 0,97. Eine Galleria-Einheit entsprach demnach 10,6 pg JH III/mg Paraffin.

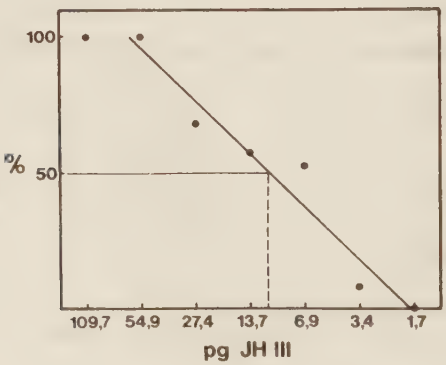



Abb. 7 Spezifische Aktivität des JH III im Galleria-Wachs-Test
Aus der Regressionsgerade der Prozent positiver Reaktion der operierten Galleria-Puppen bei gegebener JH-Konzentration wurde die einer Galleria-Einheit entsprechende JH-Konzentration extrapoliert.

### 2.1.2. Empfindlichkeit der Galleria-Puppen für JH III im Jahreszyklus

Die Empfindlichkeit des Galleria-Stammes wurde regelmäßig in 4 - 6 wöchigen Intervallen mit Eichkurven (vgl. II.3.4.1.3.) geprüft. Dabei konnte über den Zeitraum von zwei Jahren beobachtet werden, daß die JH-Sensitivität Jahreszeit-abhängig schwankt (Abb. 8): Etwa von Oktober bis Ende Dezember sank sie auf die Hälfte, d.h. eine GU entsprach nur noch etwa 21 bis 27 pg JH III/mg Paraffin. Zudem verpuppten sich die Larven in diesem Zeitraum erheblich schlechter. Im Dezember verpuppten sich nur etwa 50 % der abgesammelten Larven, die anderen verharrten im Vorpuppenstadium, nachdem sie ihren Kokon gesponnen hatten. Während des Januars stieg die Empfindlichkeit wieder auf ihr Maximum und blieb mit gelegentlichen Schwankungen auf diesem Niveau[1]. Das bedeutet auch für zukünftige Untersuchungen daß Analsyen unbekannter Proben immer regelmäßig mit einer Verdünnungsreihe definierten JH's geeicht werden müssen.

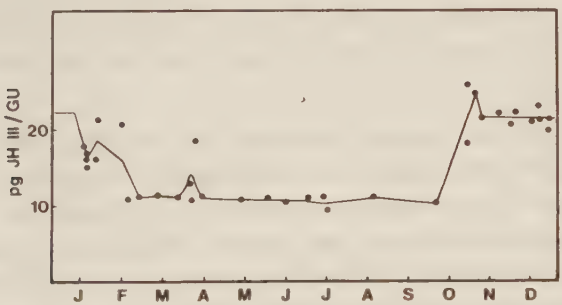



Abb. 8 Empfindlichkeit der Galleria-Puppen für JH III im Jahreszyklus

Jeder Punkt repräsentiert die einer GU entsprechende JH-Konzentration der Eichkurven während zweier Untersuchungsjahre. Großbuchstaben: Monate des Jahres

[1] Nebenbei bemerkt: Die sinkende JH-Empfindlichkeit der Gallerien im Herbst geht mit der Zunahme an Vorpuppen einher, die in einem Ruhestadium verharren. Bis zu 50% aller Larven entwickeln sich im Dezember nicht sofort zur Puppe. Dieses Ruhestadium ist wohl als Anpassung an den kommenden Winter anzusehen, den sie im Vorpuppenstadium überdauern können. MARSTON, CAMPBELL und BOLDT (1975) beobachteten Generationszeiten von bis zu 6 Monaten bei jenen Gallerien, die in die Vorpuppen-Ruhe übergegangen waren. Daß die Photoperiodik diesen Vorgang steuert, wie es oft für die Diapause zutrifft (DE WILDE, 1984), entfällt bei unseren Tieren, weil sie unter Laborbedingungen permanent im Dunklen aufwuchsen. Die Vorpuppen-Ruhe wird wohl eher durch eine endogene circadiane Rhythmik unabhängig von der Photoperiode gesteuert. Da die Corpora allata in vielen Fällen kontrollierend in die Diapause eingreifen, ist es denkbar, daß sich die physiologische Umstimmung der Gallerien-Population im Herbst auf die Reaktivität der Puppen für Juvenilhormon nach der Puppenhäutung auswirkt.

### 2.1.3. Juvenilhormon-Gehalt in der Hämolymphe von Königinnen

Der Verlauf des JH-Titers während der Königinnen-Entwicklung ist in der Abb. 9 dargestellt. Von einem Maximum in der L5-Larve von 19 732 GU/ml sank der Titer im Vorpuppenstadium rasch ab und erreichte Konzentrationen von 208 GU/ml wenige Stunden nach der Puppenhäutung. Fast während der gesamten Puppenentwicklung blieb der JH-Titer niedriger als 500 GU/ml. Teilweise konnte auch keine JH-Aktivität der Hämolymphe nachgewiesen werden. Zwei kleinere Peaks von 840 GU/ml und 1 639 GU/ml 31 bzw. 56 h nach der Puppenhäutung unterbrachen den Verlauf. Etwa 24 h vor der Imaginalhäutung stieg der JH-Titer von Konzentrationen, die nahe der Nachweisgrenze der Galleria-Tests lagen, allmählich bis zum Häutungszeitpunkt an und nahm dann bis zum Schlupf aus der Zelle stark zu. Zum Zeitpunkt des Schlüpfens betrug der JH-Gehalt 7 100 GU/ml. Der Titer frisch geschlüpfter, eintägiger und eierlegender Königinnen blieb in etwa gleich, zumindest konnte mit dem U-Test zwischen den Gruppen aufgrund der großen Schwankungen, die der JH-Test schon selber mit sich bringt, und bei einer Gruppengröße von nur 3 Proben, kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0{,}05$).

Da eine Galleria-Einheit nach der Eichkurve 11 pg JH betrug (pro mg Paraffin), ließ sich grob der JH-Gehalt der Hämolymphe kalkulieren. Beim Maximum im L5-Larvenstadium enthält die Hämolymphe 217 ng JH/ml Hämolymphe. Bei den Adulten betrug der Titer 78 ng/ml Hämolymphe. Das entspräche einer Molarität von $8{,}1 \times 10^{-7}$ M bei Larven bzw. $2{,}9 \times 10^{-7}$ M bei Adulten. In der gesamten Entwicklungsphase zwischen Puppen- und Imaginalhäutung wurde die Konzentration von $1 \times 10^{-7}$ M nicht überschritten.

### 2.1.4. Juvenilhormon-Gehalt der Hämolymphe von frisch geschlüpften Drohnen und Ammenbienen

50 µl Hämolymphe frisch geschlüpfter Drohnen wurden extrahiert und auf ihren JH-Gehalt hin untersucht. Im Galleria-Test war keine positive Reaktion zu erkennen. Das heißt, diese Drohnen hatten praktisch kein Juvenilhormon in der Hämolymphe. Hochgerechnet muß der Titer niedriger als $7{,}3 \times 10^{-8}$ M/l gewesen sein. REMBOLD (persönl. Mittlg.) fand bei gleichalten Drohnen mit GC-MS-Analysen auch kein Juvenilhormon.

Wie bereits in Tabelle 1 aufgeführt, hatten vom Brutnest abgekehrte Arbeiterinnen einen JH-Titer von 5 436 GU/ml Hämolymphe, oder anders ausgedrückt 59,8 ng JH III/ml Hämolymphe. Das entspricht einer Molarität von $2{,}2 \times 10^{-7}$ M/l und in der Größenordnung dem Titer adulter Bienenköniginnen.

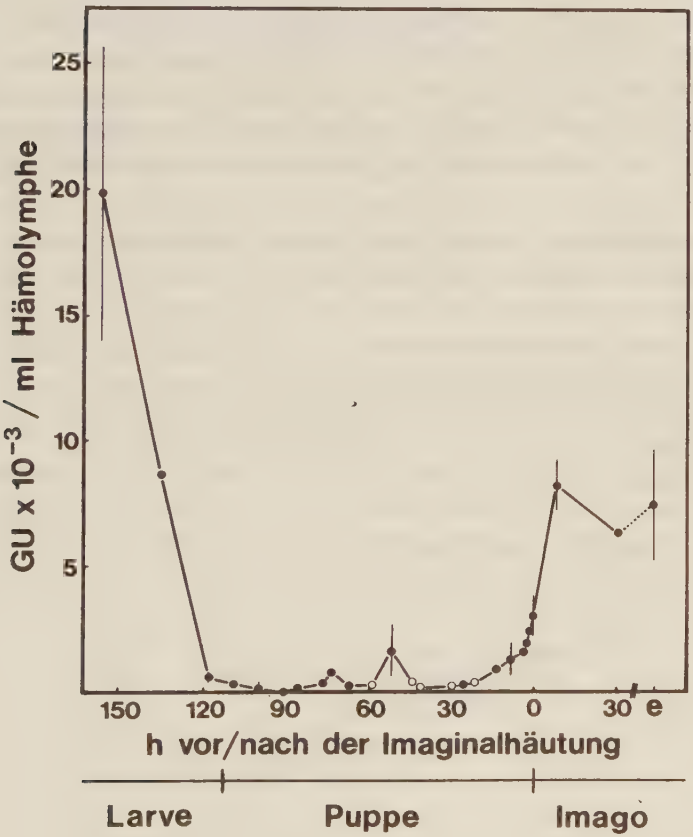



Abb. 9 JH-Gehalt der Königinnen-Hämolymphe verschiedener Entwicklungsstadien

Die Daten repräsentieren Mittelwerte von mindestens drei Stichproben. Standardabweichungen < 5% sind nicht wiedergegeben. Im Galleria-Test nicht nachweisbare JH-Konzentrationen sind mit ihren Grenzwerten als offfene Kreise dargestellt. e = eierlegende Königin

2.1.5. Die Juvenilhormon-Syntheseaktivität der Corpora allata von Bienenköniginnen

Für diesen Versuch wurden 2 Königinnen-Puppen des Stadiums P 8, d.h. 38 h vor dem Schlupf, 3 frisch geschlüpfte Königinnen, 2 vier Stunden lang im Volk gekäfigte Jungköniginnen und 3 schon 12 h lang im Volk gekäfigte Jungköniginnen verwendet.

Die Corpora allata frisch geschlüpfter Königinnen, 4,5 h inkubiert, synthetisierten JH III (s. Tab. 8). Bei den erheblich kleineren Corpora allata der um 38 h in ihrer Entwicklung jüngeren Königinnen-Puppen ließ sich hingegen keine Juvenilhormon-Synthese nachweisen. Die gemessene Aktivität entspricht einer Gesamtausbeute von 0,35 pmol JH III/Corpora allata-Paar/h.

Bei den sofort nach dem Schlüpfen gekäfigten Jungköniginnen, die in weisellose Fünf-Waben-Völker gehängt wurden, sank die Juvenilhormon-Synthese schon nach vier Stunden um etwa 60 % (s. Tab. 8 und Abb. 10). Die gemessenen JH-Syntheseaktivitäten sind nach dem U-Test (MANN und WHITNEY, 1947) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,10 signifikant niedriger als die der ungekäfigten Jungköniginnen . Die Corpora allata zwölf Stunden lang gekäfigter Jungköniginnen synthetisierten kein Juvenilhormon.

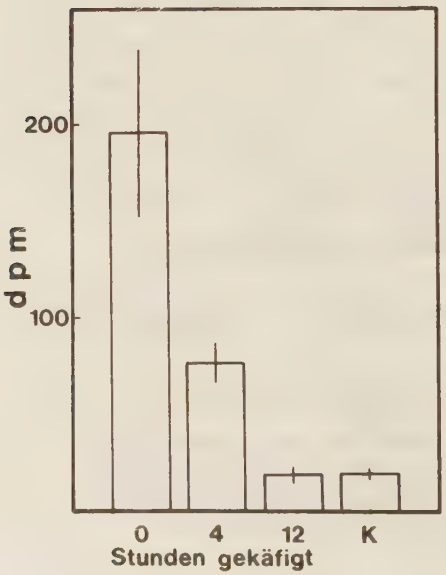



Abb. 10

In-vitro-JH-Syntheseaktivität der Corpora allata frisch geschlüpfter Königinnen in Abhängigkeit von der Dauer, die sie im Käfig eingesperrt waren.

Legende s. Tab. 8; K = Kontrolle

Tab. 8 Juvenilhormon-Synthese der Corpora allata von Königinnen unterschiedlicher Entwicklungsstadien in vitro

| Stadium | n | $^{14}$C-Methyl-Einbau in JH III (dpm) x̄ | s |
|---|---|---|---|
| Puppe P 8, 38 h vor der Imaginalhäutung | 2 | 25,0 | 4,2 |
| Frisch geschlüpfte Königin, sofort präpariert | 3 | 196,3 | 45,4 |
| 4 h gekäfigt | 2 | 76,9 | 10,0 |
| 12 h gekäfigt | 3 | 19,3 | 4,1 |
| Kontrolle | 2 | 19,9 | 3,1 |

2.1.6. Corpora allata-Volumen von Königinnen-Puppen und jungen Imagines

Das Volumen der Corpora allata wurde aus den Mittelwerten der paarigen Drüsen errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Das Volumen blieb in der Mitte der Puppenphase konstant. Gegen Ende der Phase, 15 h vor der Imaginalhäutung, stieg es auf das Doppelte an und von der Imaginalhäutung bis zum Schlupf aus der Weiselzelle nocheinmal um 60 %.

Tab. 9 Volumina der Corpora allata von Königinnen unterschiedlicher Entwicklungsstadien[1]

| Stadium | h[2] | CA-Volumen ($10^6 \mu m^3$) x̄ | s |
|---|---|---|---|
| Puppe, P 3 | 81 | 0,520 | 0,106 |
| Puppe, P 10 | 26 | 0,552 | 0,082 |
| Puppe, P11-12 | 15 | 0,995 | 0,142 |
| Puppe, P12-13 | 9 | 0,931 | 0,214 |
| Puppe, P 14 | 5 | 0,967 | 0,163 |
| Imago | 0 | 1,131 | 0,321 |
| Imago, geschlp. | | 1,769 | 0,477 |

[1] n = 4 [2] h bis zur Imaginalhäutung

## 2.2. Ecdysteroide

### 2.2.1. Ecdyson-Standard-Eichkurve und die Vergleichskurve verdünnter Hämolymphextrakte

Exemplarisch für die bei jedem RIA notwendige Eichkurve mit Ecdyson wird die Kurve dargestellt, die zur Bestimmung der Ecdyson-Konzentration in der Hämolymphe weiselrichtiger Arbeiterinnen diente. Mit dieser Kurve wurde zugleich eine Kurve verglichen, die aus einer Verdünnungsreihe von 10 µl RIA-aktiver Königinnen-Puppen-Hämolymphe ermittelt wurde (Abb. 11). Beide Kurven verliefen nahezu parallel und wiesen daraufhin, daß die RIA-aktiven Substanzen der Bienenhämolymphe dem Bindungsverhalten des Ecdysons als Standard entsprechen.

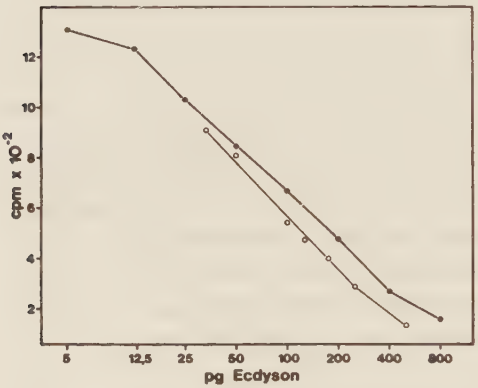



Abb. 11

Eichkurve des Ecdysteroid-Radioimmunoassays.

Mit der Eichkurve aus bekannten Ecdyson-Konzentrationen (●) wurden Hämolymph-Extrakte (O) in Verdünnungen in ihrer Bindungsfähigkeit im RIA verglichen. Als Probe dienten 10 µl Königinnenpuppen-Hämolymphe in den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:20 und 1:30.

### 2.2.2. Bestimmung der Extraktionsausbeute für Ecdyson aus Bienen-Hämolymphe

Je 3 Hämolymphproben von 1 µl und 5 µl Puppen-Hämolymphe aus einem Hämolymph-Pool wurden mit $^{3}$H-Ecdyson als internem Standard extrahiert und die Ausbeute nach der Extraktion bestimmt (Tab. 10). Sie betrug 97% und war unabhängig vom eingesetzten Hämolymphvolumen, da die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im U-Test ($p = 0{,}05$) statistisch nicht signifikant waren.

Tab. 10 Extraktionsausbeute für Ecdyson[1]

| Probe | n | Radioaktivität des Extraktes (cpm) $\bar{x}$ | s | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 µl HI + Tracer | 3 | 4086 | 127 | 97,02 |
| 5 µl HI + Tracer | 3 | 4112 | 82 | 97,64 |
| Kontrolle A | 2 | 4197 | 69 | 99,66 |
| Kontrolle B | 2 | 4211 | 72 | 100,00 |

[1] Proben von 1 bzw. 5 µl Puppen-Hämolymphe (HI) wurden mit $^{3}$H-Ecdyson als internem Standard versetzt, extrahiert und die Radioaktivität des Extraktes im LSC gemessen.
Kontrolle A: Tracer ohne Hämolymphe extrahiert
Kontrolle B: Tracer direkt im LSC gemessen

### 2.2.3. Ecdysteroid-Titer

#### 2.2.3.1. Der Ecdysteroid-Titer der Hämolymphe von Arbeiterinnen

In der Adultentwicklung weiselrichtiger Arbeiterinnen ließen sich Ecdysteroide in Spuren nachweisen (Tab. 11a). Zum Schlupftermin betrug der Titer 10,5 pg/µl Hämolymphe, was einer Molarität von $2{,}2 \times 10^{-8}$ M entspricht. Im Laufe der nächsten zwei Entwicklungstage sank der Titer allmählich ab, bei fünf Tage alten Arbeiterinnen war der Titer so gering, daß die Nachweis grenze des Assays - auch wenn Hämolymphpools von mehreren Arbeiterinnen untersucht wurden - unterschritten wurde. Lediglich bei 8, 9 und 16 Tage alten Arbeiterinnen war ein Titer von etwa $1 \times 10^{-8}$ M nachzuweisen. Bei über 20 Tage alten Arbeiterinnen betrug er weniger als $5 \times 10^{-9}$ M. Zusätzlich untersuchte Arbeiterinnen aus dem Flugraum enthielten keine nachweisbaren Mengen an Ecdysteroiden.

Von drei Hämolymphpools weiselloser Arbeiterinnen konnte nur in einem Fall eine Ecdysteroid-Aktivität im RIA von $4 \times 10^{-9}$ M gemessen werden, die beiden anderen Pools enthielten weniger als $1{,}4 \times 10^{-9}$ M (Tab. 11b).

Tab. 11 Ecdysteroid-Titer in der Hämolymphe adulter Arbeiterinnen

| Alter | n | pg Ecdyson-Äquivalente/µl | |
|---|---|---|---|
| | | x̄ | s |
| a. weiselrichtig | | | |
| frisch geschlüpft | 3 | 10,5 | 1,6 |
| 8 h | 3 | 7,3 | 2,7 |
| 1 d | 2 | 6,0 | 2,8 |
| 2 d | 3 | 3,2 | 0,5 |
| 5 d - 7 d | 9 | <2,5 | |
| 8 d | 2 | 2,3 | 0,8 |
| 9 d | 3 | 5,4 | 2,1 |
| 16d | 2 | 2,8 | 0,8 |
| 21d-23 d | 6 | <1,9 | |
| Flugraum-Bienen 8 - 14 d | 9 | <2,7 | |
| b. weisellos | | | |
| Pool I ( 3 µl) | 1 | <0,7 | |
| Pool II (15 µl) | 1 | <0,7 | |
| Pool III(15 µl) | 1 | 2,0 | |

2.2.3.2. Der Ecdysteroid-Titer der Hämolymphe von Königinnen

Im Verlauf der Puppenentwickung wurde schon 12 Stunden nach der Puppentung ein Ecdysteroid-Peak gefunden (Abb. 12). Sein Maximum betrug 683 pg Ecdyson-Äquivalente/µl Hämolymphe entsprechend $1,4 \times 10^{-6}$M. Während der nächsten drei Tage nahm der Ecdysteroid-Titer der Hämolymphe kontinuierlich ab, erreichte einen Tag vor der Imaginalhäutung ein Plateau von etwa 100 pg/µl, das heißt eine molare Konzentration von $2,1 \times 10^{-7}$M. Innerhalb der letzten zehn Stunden vor der Imaginalhäutung sank der Titer um eine Zehnerpotenz bis auf 10,9 pg/µl oder $2,3 \times 10^{-8}$M. Das heißt, daß in der gesamten Puppenentwicklung nur ein Ecdysteroid-Peak vorkommt und der Titer im Laufe der Puppenentwicklung bis zur Imaginalhäutung um zwei Zehnerpotenzen allmählich abnimmt.

Bei den Imagines sank der Titer nach der Imaginalhäutung während der ersten Tage weiter und war 100 Stunden nach der Imaginalhäutung soweit gesunken - auf weniger als $1 \times 10^{-8}$ M -, daß keine RIA-Aktivität mehr nachzuweisen (Tab. 12). Dagegen hatten alle drei untersuchten eierlegenden Königinnen einen Titer, der - deutlich über der Nachweisegrenze - mit 12,7 pg/µl und einer Molarität von $1,7 \times 10^{-8}$ M höher als bei Jungköniginnen, weiselrichtigen und weisellosen Arbeiterinnen war.

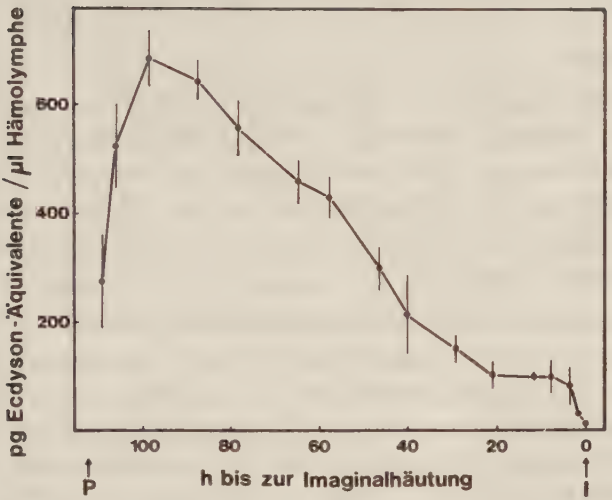



Abb. 12 Ecdysteroid-Titer in der Hämolymphe von Königinnenpuppen.

Die Daten repräsentieren Mittelwerte von mindestens 3 Stichproben. Standardabweichungen kleiner als die Durchmesser der Punkte sind nicht gesondert aufgeführt.
P = Puppenhäutung I = Imaginalhäutung

Tab. 12 Ecdysteroid-Titer in der Hämolymphe adulter Bienenköniginnen

| Alter | n | Ecdyson-Äquivalente pg/µl $\bar{x}$ | s | Mol/l |
|---|---|---|---|---|
| gerade gehäutet | 5 | 10,9 | 3,1 | $2,3 \times 10^{-8}$ |
| gerade geschlüpft | 3 | 6,4 | 2,2 | $1,3 \times 10^{-8}$ |
| 36 h | 2 | 6,8 | 2,7 | $1,4 \times 10^{-8}$ |
| 100 h | 3 | <4,8 | | $<1,0 \times 10^{-8}$ |
| 124 h | 1 | <3,7 | | $<0,8 \times 10^{-8}$ |
| eierlegend | 3 | 12,7 | 5,6 | $2,7 \times 10^{-8}$ |

## 3. Identifizierung und Charakterisierung von Vitellogenin

### 3.1. Vitellogenin

Außer der Bestimmung der Entwicklungsstadien und der in den entsprechenden Stadien herrschenden Hormontiter mußte zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit vor allem das Vitellogenin der Bienenkönigin identifiziert werden, das vier Kriterien erfüllen muß (vgl. I.1.): Hohe Konzentration im Ovar, selektive Aufnahme, exogene Herkunft (Fettkörper) und Hauptvorkommen in Weibchen.

Aus Hämolymphe eierlegender Königinnen konnten mit SDS-PAGE 27 anfärbbare Polypeptide aufgetrennt werden (Abb. 13). Ihre errechneten Molekulargewichte sind in Tabelle 13 wiedergegeben. Die zugehörige Eichkurve der Molekulargewichtsbestimmung (Abb. 14) aus der logarithmischen Regression der von den Markerproteinen erreichten rel. Wanderungsstrecke hatte einen Regressionskoeffizienten von r = 0,9989. Das Polypeptid von 183 K überragte alle anderen in seiner Konzentration bei weitem. Im gleichen Gel war auch Ovarhomogenat, das zuvor für 1 h in vitro mit $^{3}$H-Leucin inkubiert worden war, elektrophoretisch aufgetrennt worden. Es enthielt als Hauptkomponente ebenfalls ein Polypeptid von 183 K neben einer Vielzahl anderer Polypeptide. Bei diesem Polypeptid mußte es sich um Vitellin handeln, da Vitellin charakteristischerweise im Ovar den größten Anteil der löslichen Proteine stellt.

Ein zweites Kriterium, nämlich das der selektiven Aufnahme in die Oocyte, ließ sich mit dieser Methodik nur indirekt aus dem Vergleich des Vorkommens in Hämolymphe und Ovar überprüfen. Außer dem Polypeptid von 183 K kamen zwei weitere (151 K und 129 K) - zumindest ihrer Wanderungsstrecke im Gel nach - in Hämolymphe und Ovar vor. Zwei Polypeptide, die in der Hämolymphe in relativ hoher Konzentration vorlagen, konnten im Ovar nicht nachgewiesen werden. Somit wurde indirekt eine selektive Aufnahme der Polypeptide 183 K, 151 K und 129 K festgestellt, da es Hämolymphpolypeptide gab, die nicht von den Oocyten aufgenommen wurden.

Die Fluorographie des Gels offenbarte, daß das Polypeptid von 183 K in der Hämolymphe eierlegender Königinnen am stärksten radioaktiv markiert war (Abb. 13). Erheblich schwächer war die Markierung der Polypeptide 151 K, 129 K, und noch schwächer 237 K, 81 K, 76 K und 55 K. Im Synthesemuster des Ovarhomogenats waren u.a. zwei helle Stellen erkennbar. Sie entsprachen

Tab. 13 Molekulargewichte der Polypeptid-Banden von mit SDS-PAGE aufgetrennter Hämolymphe eierlegender Königinnen[1]

| Bande | MW (K) | Bande | MW (K) | Bande | MW (K) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1* | 237 | 10 | 142,5 | 19 | 89 |
| 2 | 221 | 11* | 129 | 20 | 85 |
| 3 | 204 | 12 | 124 | 21* | 81 |
| 4** | 183 | 13 | 122 | 22* | 76 |
| 5 | 171 | 14 | 118 | 23* | 72 |
| 6 | 162 | 15 | 111 | 24 | 66 |
| 7 | 155 | 16 | 99 | 25* | 55 |
| 8* | 151 | 17 | 97 | 26 | 51,5 |
| 9* | 147 | 18 | 92 | 27* | 48 |

* Hauptbanden ** Vitellogenin [1] s. Abbildung 13

Abb. 13

Muster der Proteine von Hämolymphe und Ovarhomogenat eierlegender Königinnen und ihre radioaktive Markierung.

SDS-PAGE (5-12,5%)

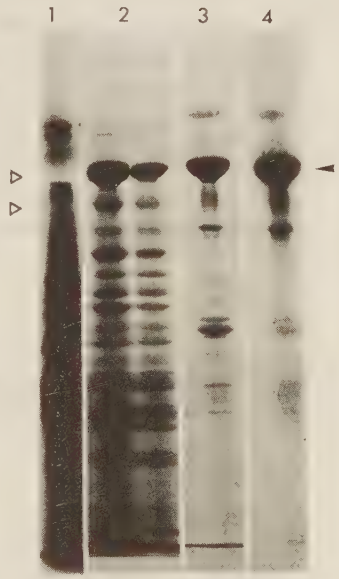
1 = Fluorographie von 2., sehr lange Expositionsdauer (13 Wochen)

2 = Homogenat eines zuvor mit $^{3}H$-Leucin in vitro inkubierten Ovars (eierlegende Königin)

3 = 0,5 µl Königinnen-Hämolymphe, Tracer-markiert, 75 min inkubiert.

4 = Fluorographie von 3., 2 Wochen exponiert.

Vitellogenin bzw. Vitellin mit ► gekennzeichnet, schwach/nicht markierte Banden im Ovarhomogenat mit ▷ gekennzeichnet.



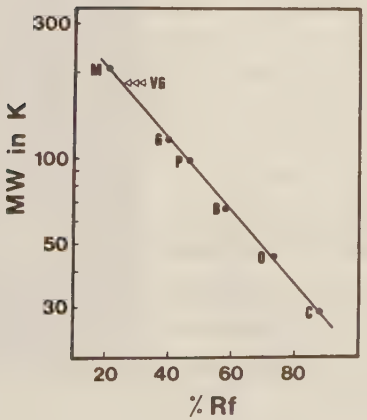




Abb. 14

Eichkurve der Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Gradienten-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (5-12,5%).

Molekulargewichtsmarker: M = Myosin, G = ß-Galaktosidase, P = Phosphorylase b, B = BSA, O = Ovalbumin, C = Carboanhydrase.
% Rf = rel. Wanderungsstrecke im Gel
VG = Vitellogenin

in Wanderungsstrecke und Form den Ovarpolypeptiden von 183 K und 151 K im gefärbten Gel. Ein Polypeptid, das gerade nicht synthetisiert wird, oder eines, das exogener Herkunft ist, würde auf dem Röntgenfilm einen solchen hellen Fleck erzeugen. Es ist wahrscheinlich, daß diese beiden Polypeptide exogener Herkunft sind. Zusammenfassend ließ sich aus dieser elektrophoretischen Auftrennung von Hämolymph- und Ovar-Proteinen ableiten, daß drei Kriterien für Vitellogenin, nämlich hohe Konzentration im Ovar, selektive Aufnahme und exogene Herkunft, nur für das Polypeptid von 183 K zutrafen Es konnte deshalb als das Vitellogenin der Honigbiene bezeichnet werden.

Elektrophoretisch verhielten sich Vitellin und Vitellogenin unter denaturierenden Bedingungen gleich. In nativen Gelen wichen die beiden Hauptkomponenten von Hämolymphe und Ovar häufig in ihrer Wanderungsstrecke geringfügig voneinander ab (Abb. 15). Das Molekulargewicht von Vitellogenin betrug unter nativen Bedingungen 215 K. Beim Vergleich des Hämolymphproteinmusters von Königinnen, Arbeiterinnen und Drohnen (Abb. 16) kam das Polypeptid von 183 K vorwiegend bei den beiden weiblichen Kasten der Honigbiene als eine der Hauptbanden vor. Bei Drohnen war in diesem Molekulargewichtsbereich nur eine schwache Bande sichtbar. Damit ist auch das letzte Kriterium für Vitellogenin erfüllt. Das Polypeptid von 151 K ist dieser elektrophoretischen Auftrennung nach weibchenspezifisch.

Abb. 15

Auftrennung von Hämolymphe und Ovarhomogenat in nativer PAGE

1 = Königinnen-Hämolymphe (7d)
2 = Ovar-Homogenat
►= Vitellogenin bzw. Vitellin-Fraktion, PAGE 6%

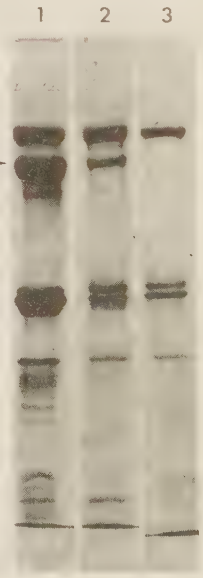



Abb. 16

Muster der Hämolymphproteine von Königin, Arbeiterin und Drohn

1 = Königin, 3 d, 1 µl Hämolymphe
2 = Arbeiterin, 4 d, 3 µl Hämol.
3 = Drohn, 4 d, 3 µl Hämolymphe
►= Vitellogenin

SDS-PAGE (5-12,5%)

3.2. Antiserum gegen Vitellogenin

Die o.g. Befunde müssen allerdings insofern eingeschränkt werden, da identische elektrophoretische Mobilität zweier Proteine nicht per se auch Identität der Proteine bedeutet. Deshalb wurde ein Antiserum gegen das Polypeptid von 183 K hergestellt und seine Spezifität untersucht. Zunächst wurwurde das Antiserum mit Ammen-Hämolymphe in der zweidimensionalen Imm elektrophorese (vgl. II.3.7.3.) getestet. Es resultierte ein einziger Peak, der anhand dieses immunologischen Kriteriums die Monospezifität des Antiserums belegte (Abb. 17).

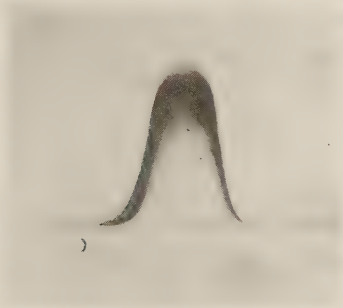


Abb. 17
Spezifität des Antiserums gegen Vitellogenin in der zweidimensionalen Immunelektrophorese

2 µl Königinnen-Hämolymphe wurden in 5%-Antiserum-haltiger Agarose elektrophoretisch aufgetrennt.

Als ergänzende Methode wurde die Fluorographie elektrophoretisch im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennter Proben herangezogen. U.a. wurden mit der indirekten Immunopräzipitation (vgl. II.3.8.) an das Antiserum gebundene und isolierte Moleküle mit SDS wieder gelöst und im Gel elektrophoretisch getrennt. Aus dem gefärbten Gel wie auch aus der Fluorographie ging hervor (Abb. 18), daß das Antiserum aus der Hämolymphe eierlegender Königinnen nur das mutmaßliche Vitellogenin (183 K) gebunden hatte. Die anderen drei Hauptbanden, die im Gel als SDS-denaturierte Produkte der Protein A-IgG-Antigen-Komplexe erschienen, waren BSA (66 K) und die schweren und leichten Ketten der IgG-Moleküle (52 K und 23-25 K). Damit konnte bestätigt werden, daß das Antiserum nur ein Polypeptid der Hämolymphe band und deshalb als monospezifisch angesehen werden konnte.

Im gleichen Experiment waren außerdem Ovar-Homogenat, das 1 h lang mit Tracer in vitro inkubiert worden war, und die an das Antiserum gebundenen Proteine des des Ovar-Homogenats aufgetrennt worden. Aus dem Ovar-Homogenat hatte das Antiserum nur das Polypeptid von 183 K gebunden, das aber

nicht radioaktiv markiert war. D.h., daß das Antiserum, das gegen ein Hämolymphprotein gerichtet war, ein immunologisch und vom Molekulargewicht identisches Polypeptid aus dem Ovar band, das zugleich die Hauptkomponente der löslichen Ovarproteine darstellte. Folglich mußte es sich um das Vitellin handeln.

Darüberhinaus wurde in einer weiteren PAGE untersucht, welche Polypeptide aus Homogenat und Medium eines in vitro inkubierten Königinnen-Fettkörpers an das Antiserum binden (Abb. 19). Im Homogenat wurden zwei markierte Banden aus der Fülle markierter Banden mit der indirekten Immunopräzipitation isoliert. Sie hatten ein Molekulargewicht von 183 K und 179 K. Nur die höhermolekulare Bande war im Gel erkennbar. Das Medium, in dem der Fettkörper inkubiert worden war, enthielt erheblich weniger markierte Banden als der Fettkörper und außerdem wurde nur eine der markierten Banden (183 K) mit dem Antiserum isoliert. Damit war zugleich zum ersten Mal definitiv belegt, daß der Fettkörper der Honigbiene Syntheseort des Vitellogenins ist. Er sezerniert es in die Hämolymphe bzw. in vitro in das Medium. Damit war das zweite Kriterium für Vitellogenin, seine exogene Herkunft, erfüllt.

Ungeklärt blieb bis dahin, um was für ein Polypeptid von 179 K es sich handelte, das vom Antiserum im Fettkörper-Homogenat gebunden worden war. Denn es konnte bedeuten, daß das Antiserum diese Bande unspezifisch gebunden hatte, das Antiserum doch nicht monospezifisch war, oder es sich um einen präsekretorischen Vorläufer von Vitellogenin handelte, wie es die hohe Radioaktivität und Bindungsaffinität der Bande an das Antiserum suggerierte. Aus diesem Grunde wurde der Fettkörper in vitro einem pulse-chase-Experiment unterworfen. Die elektrophoretische Auftrennung des Fett-Homogenats, nachdem der Fettkörper 1 min in vitro mit Tracer inkubiert worden war, ergab im gefärbten Gel eine Bande mit dem Molekulargewicht von 183 K. Auf der Fluorographie war dagegen eine Bande sichtbar, deren Molekulargewicht ca. 4 K niedriger lag. Sie wurde vom Antiserum gebunden. Bei Fettkörpern, die nach 1 min $^{3}$H-Leucin-Inkubation mit kaltem Leucin gewaschen und dann für 1 h weiter inkubiert wurden, und als Homogenate aufgetragen worden waren, war die Markierung im Bereich von 183 K zu sehen. Das gleichzeitig gesondert untersuchte Medium enthielt die gleiche stark markierte Polypeptid-Bande. Es sei hier schon kritisch angemerkt, daß es auch bei zwei entsprechenden Experimenten mit chase-Perioden von 20 und 30 min nicht gelang, beide Banden (183 und 179 K) zugleich markiert zu zeigen,

sondern nur die 183 K-Bande. Die Verschiebung der Aktivität dürfte wohl unter diesen Bedingungen nach kürzerer Zeit erfolgen.

Fazit: Vitellogenin ist unter denaturierenden Bedingungen ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 183 K (nativ: 215 K). Es wird vom Fettkörper synthetisiert, in die Hämolymphe sezerniert und vom Ovar selektiv aufgenommen, wo es als Vitellin den Hauptanteil löslischer Proteine stellt. Das Antiserum bindet dieses Polypeptid in der Hämolymphe von Königinnen und Arbeiterinnen (Daten nicht extra aufgeführt), im Ovar, in Homogenat und Medium in vitro inkubierter Fettkörper. Im Homogenat des Fettkörpers wird ein zweites Polypeptid von 179 K gebunden, das wahrscheinlich den intrazellulären, präsekretorischen Vorläufer von Vitellogenin darstellt.

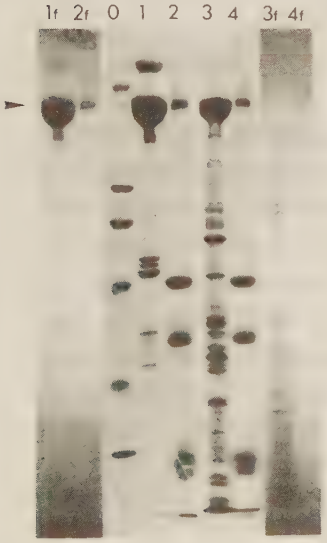
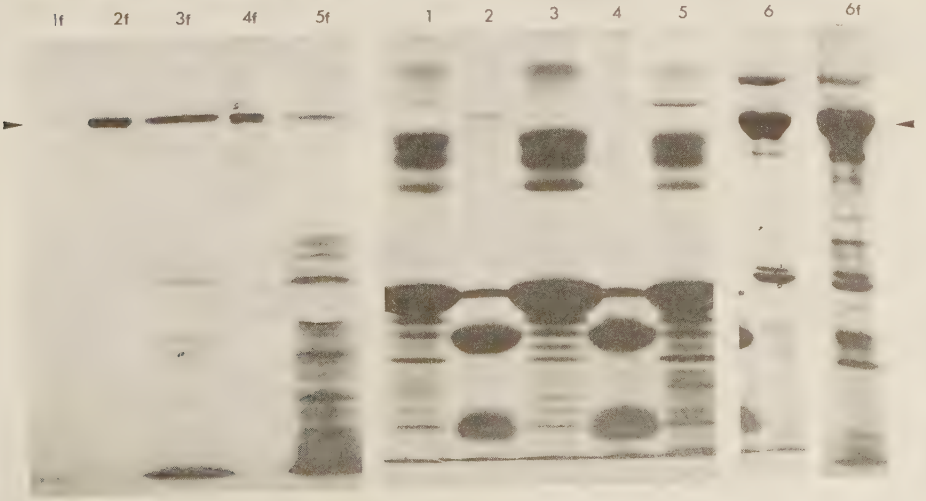



Abb. 18 Charakterisierung des Vitellogenin-Antiserums II: Bindung von Proteinen aus Hämolymphe und Ovar

SDS-Gradienten-PAGE (5-12,5%) und Fluorographie (f) von Hämolymphe einer $^{3}$H-Leucin injizierten eierlegenden Königin(1, 1f) und Ovarhomogenat (3, 3f) sowie der in SDS aufgelösten Präzipitate der indirekten Immunpräzipitation mit Protein A und Vitellogenin-Antiserum aus der gleichen Hämolymphe (2, 2f) und Ovarhomogenat (4, 4f). 0 = Markerproteine. Von oben: Myosin, ß-Galaktosidase, Phosphorylase b, BSA, Ovalbumin und Carboanhydrase

Abb. 19 Charakterisierung des Vitellogenin-Antiserums III: Binding von Proteinen aus in vitro in kubiertem Fettkörper und in vitro-Medium

SDS-Gradienten-PAGE (5-12,5%) und Fluorographie (f). 1 (Cycloheximid-Kontrolle, Fk-Homogenat), 2 (Protein A-Präzipitat von 3), 3 (Medium), 4 (Protein A-Präzipitat von 5), 5 (Fk-Homogenat), 6 (Hämolymphe der eierlegenden Königin)



## 4. Hämolymph-Protein- und Vitellogenin-Synthese bei Königinnen in vivo

### 4.1. Kinetik der Tracer-Inkorporation in Hämolymphproteine

Die Kinetik der Inkorporation von $^{3}$H-Leucin wurde an pharat adulten, frisch geschlüpften und eierlegenden Königinnen untersucht (Abb. 20). Die Kurven zeigen einen charakteristischen Verlauf: Nach einer lag-phase, die auf die zeitliche Verschiebung zwischen Synthese und Sekretion der Hämolymph-Proteine zurückzuführen ist und nicht länger als 30 min dauerte, folgte eine Phase linearen Anstiegs der Inkorporation, oder anders ausgedrückt, die Syntheserate blieb dann konstant. Dann folgten eine Phase verlangsamten Tracer-Einbaus sowie ein Plateau.

Je nach Entwicklungsalter der Königinnen unterschieden sich die Kinetiken in ihrem zeitlichen Ablauf: Bei den pharat adulten Königinnen dauerte die Phase linearer Inkorporation 2 h, bei frisch geschlüpften 1,5 h und bei eierlegenden Königinnen wohl aufgrund der wesentlich höheren Syntheseaktivität nur 75 Minuten. Zudem war die Inkorporationsrate bei den pharat adulten um mehr als eine Zehnerpotenz niedriger als bei den eierlegenden Tieren. Sie betrug bei pharat adulten 210 cpm/µl/h, bei frisch geschlüpften 560 cpm/µl/h und bei eierlegenden Königinnen 2 300 cpm/µl/h.

Auf der Grundlage dieser Kinetiken wurde die Inkubationszeit für alle folgenden in vivo-Untersuchungen auf 75 Minuten begrenzt, weil unter den Versuchsbedingungen der Tracer nur bis zu diesem Zeitpunkt bei allen untersuchten Stadien noch mit konstanter Rate eingebaut wurde.

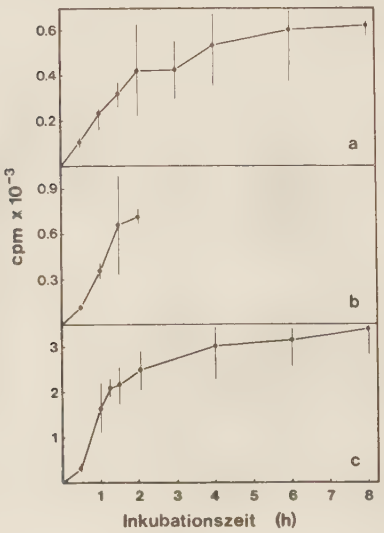



Abb. 20
Kinetik der $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Hämolymphproteine von Bienenköniginnen in vivo.

a = pharat adult, 30 h vor der Imaginalhäutung
b = frisch geschlüpft
c = eierlegend
n = 3-5

## 4.2. Quantitative Synthese von Hämolymph-Proteinen und Vitellogenin im Verlauf der königlichen Ontogenese

### 4.2.1. Pharat Adulte

Pharat adulte Königinnen verschiedenen Alters (vgl. III.1) wurden in 3 aufeinanderfolgenden Experimenten, wie unter II.3.8. beschrieben, injiziert und ihre Hämolymphprotein- und Vitellogenin-Synthese bestimmt. Die Ergebnisse sind Tabelle 14 zusammengefaßt.

Im Laufe der Puppenentwicklung sank die Synthese von Hämolymphproteinen allmählich ab und erreichte 26 h vor der Imaginalhäutung mit 104 cpm/µl ein niedriges Niveau, das bis 7,5 h vor der Imaginalhäutung erhalten blieb. Die Mittelwerte dieser Plateau-Phase unterscheiden sich im t-Test ($p=0,05$) nicht signifikant voneinander. Fünf Stunden vor der Imaginalhäutung stieg die Hämolymph-Protein-Syntheserate an und nahm bis zur Imaginalhäutung um das 2,6-fache zu.

Die Vitellogenin-Synthese ließ sich erstmalig schon 10,5 h vor der Imaginalhäutung bei allen untersuchten pharat adulten Königinnen mit der indirekten Immunpräzipitation nachweisen. Ihr Anteil stieg innerhalb weniger Stunden parallel zur Zunahme aller synthetisierten Hämolymph-Proteine von 20,9 % über 46,2 % (5 h vor Imaginalhäutung) auf 66,4 % bei der Imaginalhäutung. Die Vitellogenin-Synthese nahm allerdings stärker zu als die Synthese aller Hämolymphproteine, ohne daß die Zunahme der letzteren zählenmäßig allein auf die Vitellogenin-Synthese zurückzuführen war. Mehrfache Wiederholungen der Vitellogenin-Synthese-Untersuchungen bei Pharat-Adulten 26 h vor der Imaginalhäutung und früher bestätigten, daß in dieser Entwicklungsphase Vitellogenin noch nicht gebildet wird. Vereinzelt waren niedrige Tracer-Inkorporationen (2,1 cpm/µl bzw. 3,2 cpm/µl) im Vitellogenin-Synthese-Assay auch bei Königinnen nachzuweisen, die 15 h vor der Imaginalhäutung standen.

### 4.2.2. Imagines

Die Hämolymphprotein-Synthese stieg nach der Imaginalhäutung bis zum Schlupf um fast das Doppelte. Zwei Tage nach dem Hochzeitsflug war sie erneut 3,4-fach höher als bei frisch geschlüpften Königinnen. Danach blieb sie konstant (Tab. 15).

Die Vitellogenin-Synthese stieg im gleichen Umfang, zumal sie schon bei frisch geschlüpften Königinnen einen prozentualen Anteil von 83,9 ± 6,8 % an der Inkorporation in alle Hämolymphproteine erreicht hatte. Dieser Anteil blieb bei den untersuchten Stadien annähernd konstant. Zahlenmäßig lag die Vitellogenin-Synthese der Königinnen 2 Tage nach dem Hochzeitsflug um etwa 15 % niedriger als bei den eierlegenden, der Unterschied war aber im U-Test (p = 0,05) wegen der großen individuellen Schwankungen nicht signifikant.

Tab. 14 Tracer-Inkorporation in Vitellogenin und die Summe aller Hämolymphproteine pupaler und pharat adulter Königinnen

| Stadium | Alter* | Tracer-Inkorporation in alle Hämolymphproteine | | | Vitellogenin | | | VG/Σ** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | n | $\bar{x}$ (cpm) | s (cpm) | n | $\bar{x}$ (cpm) | s (cpm) | |
| P 4 | 71 | 4 | 1362 | 396 | 4 | 0 | 0 | |
| P 5 | 64 | 4 | 1043 | 373 | 4 | 0 | 0 | |
| P 6 | 56 | 4 | 599 | 257 | 4 | 0 | 0 | |
| P 8 | 38 | 4 | 310 | 196 | 4 | 0 | 0 | |
| | 32 | 4 | 255 | 144 | 4 | 0 | 0 | |
| P10 | 26 | 9 | 104 | 54 | 9 | 0 | 0 | |
| P11 | 21 | 10 | 79 | 28 | 10 | 0 | 0 | |
| | 15 | 8 | 87 | 32 | 8 | 0 | 0 | |
| P12 | 10,5 | 11 | 98 | 39 | 11 | 20,4 | 14,8 | 20,9% |
| P13 | 7,5 | 1 | 105,8 | | 1 | 30,7 | | 29,0% |
| P14 | 5 | 5 | 140,6 | 44,0 | 4 | 65,0 | 17,6 | 46,2% |
| Imago | 0 | 12 | 368,0 | 120,1 | 11 | 244,5 | 113,0 | 66,4% |

* h bis zur Imaginalhäutung

** relativer Anteil der Tracer-Inkorporation in Vitellogenin an Gesamtinkorporation in Hämolymphproteine

Tab. 15 Tracer-Inkorporation in Vitellogenin und die Summe aller Hämolymphproteine bei imaginalen Königinnen

| Stadium | n | Tracer-Inkorporation in alle Hämolymphproteine | | Vitellogenin | | %VG* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $\bar{x}$ (cpm) | s (cpm) | $\bar{x}$ (cpm) | s (cpm) | |
| gerade gehäutet | 12 | 368,0 | 120,0 | 244,5 | 113,0 | 66,4% |
| gerade geschlüpft | 9 | 632,6 | 162,5 | 513,0 | 148,2 | 83,9% |
| 2 d nach Hochzeitsflug | 3 | 2180 | 580 | 1509 | 201 | 69,2% |
| frisch in Eilage | 5 | 2096 | 399 | 1766 | 202 | 84,6% |

* relativer Anteil der Tracer-Inkorporation in Vitellogenin an Gesamt-Inkorporation in Hämolymphproteine

Wenn man den Zusammenhang zwischen inkorporierter Radioaktivität der Summe aller Hämolymphproteine, die nicht Vitellogenin sind, und Vitellogenin in den entsprechenden Entwicklungsstadien vergleicht, so ergeben sich Korrelationskoeffizienten zwischen r=-0,07 bei gerade gehäuteten und r=0,10 bei eierlegenden Imagines. Sie unterscheiden sich bei allen untersuchten Stadien nach t-Verteilung und t-Test (p=0,05) nicht signifikant von r = 0. Das heißt, daß die Syntheseraten von Nicht-Vitellogenin-Hämolymphproteinen und Vitellogenin nicht miteinander korreliert sind, wenn auch der relative Anteil der Vitellogenin-Synthese bei schlüpfenden bis hin zu eierlegenden Königinnen konstant blieb.

Untersuchungen an Königinnen, die schon in Eilage gewesen waren, belegten, daß die Syntheseraten außerdem in Abhängigkeit von Jahreszeit und Eilageaktivität variierten (Tab. 16). Zwar war die Tracer-Inkorporation in alle ♀TCA-präzipitierbaren Hämolymphproteine hoch, jedoch betrug der relative Anteil der Vitellogenin-Synthese bei Königinnen Anfang Oktober, als sie nur noch wenige Eier legten (50 - 100 Eier/Tag), nur 68,0 % im Gegensatz zu 84,6% bei Königinnen, die im Sommer gerade in Eilage gegangen waren. Der relative Anteil der Vitellogenin-Synthese an der Hämolymphprotein-Synthese lag mit 39,6% noch niedriger bei Königinnen, die im Herbst temporär nicht in Eilage waren. Zahlenmäßig lag die Radioaktivität der Hämolymphproteine letzterer um 40%, bei Vitellogenin gar um 65% niedriger. Der Unterschied zwischen eierlegenden und nicht eierlegenden Königinnen ist im U-Test (p = 0,05) signifikant.

Tab. 16 Tracer-Inkorporation in Vitellogenin und die Summe aller Hämolymphproteine bei Königinnen im Herbst

| | | Tracer-Inkorporation (cpm) in alle Hämolymphproteine | | Vitellogenin | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Königin | n | $\bar{x}$ | s | $\bar{x}$ | s | %VG* |
| eierlegend | 3 | 3806 | 607 | 2588 | 206 | 68,0 |
| nicht eierlegend | 3 | 2309 | 236 | 914 | 198 | 39,6 |

* relativer Anteil der Tracer-Inkorporation in Vitellogenin an der Gesamtinkorporation in Hämolymphproteine

Die parallel dazu an den gleichen Proben vorgenommene elektrophoretische Auftrennung der Hämolymphproteine (Abb. 21) belegte, daß sich das Muster der Hämolymphproteine von eierlegenden und nicht eierlegenden Königinnen qualitativ nicht wesentlich unterschied. Es fiel auf, daß der Vitellogenin-Titer bei nicht eierlegenden Königinnen deutlich niedriger war als bei eierlegenden Königinnen. Auch das Polypeptid von 237 K war weniger stark in der Hämolymphe vorhanden. Was die Synthese der Hämolymphproteine angeht, so spiegelt die Fluorographie die mit dem RIA gewonnenen Daten wider: Die Vitellogenin-Synthese war bei eierlegenden Königinnen höher als bei nicht eierlegenden. Alle Polypeptide, die bei eierlegenden markiert waren, waren ebenso bei nicht eierlegenden Königinnen markiert. Während die Polypeptide von 147 K und 129 K bei nicht eierlegenden schwächer markiert waren, traf dies nicht für die Banden von 237 K, 76 K und 35 K zu. Dieser Sachverhalt kann als grobes, indirektes Indiz dafür gelten, daß die Vitellogenin-Synthese unabhängig von der Synthese anderer Hämolymphproteine reguliert wird.

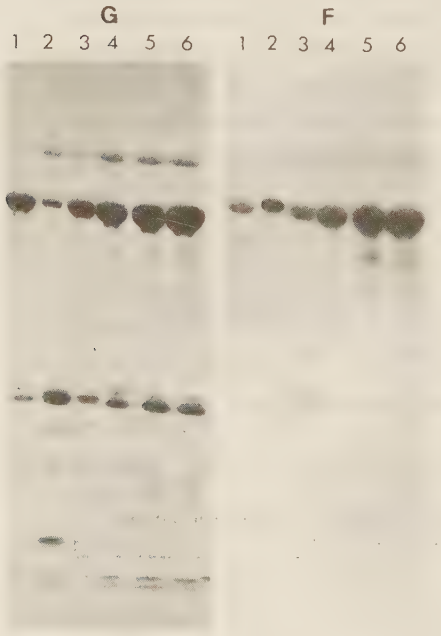



Abb. 21

Muster der Hamolymphproteine und ihrer Synthese von eierlegenden und nicht eierlegenden Königinnen

Elektrophoretische Auftrennung und Fluorographie im SDS-Gradienten-PAG (5-12,5%) von je 0,5 µl Hämolymphe mit $^{3}$H-Leucin injizierter Königinnen

1-3 = Hämolymphe nicht eierlegender Königinnen
4-6 = Hämolymphe eierlegender Königinnen
G = PA-Gel, F = Fluorographie
► = Vitellogenin-Fraktion

## 4.3. Das Muster der Hämolymphproteine und ihre Synthese im Verlauf der Ontogenese von Königinnen

Mit der elektrophoretischen Auftrennung der Hämolymphproteine im SDS-Polyacrylamid-Gradientengel und der anschließenden fluorographischen Auswertung ihrer Markierung wurde das Muster neu synthetisierter Hämolymph-Polypeptide im Verlauf der Ontogenese am Beispiel von L 5-Larven, Puppen des Stadiums P 3, P 6 und P 14, d.h. 81, 56 und 5 h vor der Imaginalhäutung, sowie gerade gehäuteten und eierlegenden Imagines verfolgt (Abb. 22). Die Polypeptide ließen sich in drei verschiedene Gruppen unterteilen: Polypeptide, die nur bei Larven und Puppen, Polypeptide, die nur bei Imagines (und pharat Adulten) und Polypeptide, die sowohl bei Larven, als auch bei Puppen und Imagines vorkamen. Für die Puppenphase spezifische Polypeptide konnten nicht nachgewiesen werden.

Die meisten Polypeptide, die bei L5-Larven gefunden worden waren, verschwanden im Laufe der Puppenentwicklung aus der Hämolymphe. Darunter waren 3 Hauptbanden: Die eine mit einem MW vom 158 K, die am stärksten

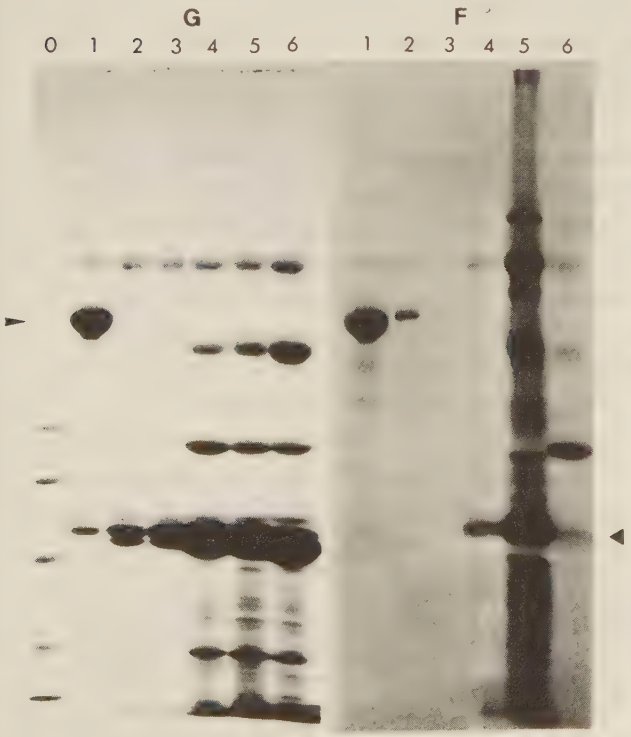



Abb. 22

Muster und Synthese der Hämolymphproteine von Königinnen im Verlauf der Ontogenese

SDS-Gradienten-Polyacrylamid-Gel (G) und Fluorographie (F) von Hämolymphe einzelner Tiere folgender Stadien:
1 = eierlegend, 0,5 µl
2 = frisch imaginal gehäutet, 2 µl
3 = Puppenstadium P 14, 2µl
4 = Puppenstadium P 6, 1 µl
5 = Puppenstadium P 3, 1 µl
6 = L5-Larve, 5 µl

►= Vitellogenin-Bande
◀ = 72,5 K
0 = Markerproteine s. Abb. 18

bei L5-Larven vorlag, konnte bei gerade gehäuteten Imagines nur noch in Spuren und bei eierlegenden Königinnen nicht mehr nachgewiesen werden. Die zweite Hauptbande (108 K) verschwand schon früh in der Puppenentwicklung und kam bei pharat Adulten nicht mehr vor, während die dritte Hauptbande (72,5 K), die bei L5-Larven die relativ größte Konzentration aller Polypeptide besaß, allmählich bis zu den frisch geschlüpften Königinnen in ihrer Konzentration abnahm. Neben diesen Hauptbanden verschwanden im gleichen Entwicklungszeitraum die weniger konzentriert vorkommenden Polypeptide von 216 K, 205 K, 95 K, 89 K, 84 K und viele weitere Polypeptide, die kleiner als 70 K waren, u.a. die prominenteren von 64 K, 54 K und 45 K.

Eine kleine Anzahl von Hämolymph-Polypeptiden kam bei Puppen und Imagines vor, vor allem die Hauptbanden mit 237 K, 81 K und 76 K.

Die dritte Gruppe, die diejenigen Polypeptide umfaßte, die erst bei pharat Adulten bzw. Imagines auftraten, besaß im Vitellogenin (183 K) ihren hervorstechendsten Vertreter. Zur gleichen Zeit, zu der das Vitellogenin als Bande erkennbar wurde, trat eine weitere Polypeptidbande von 55 K auf. Bei eierlegenden Königinnen erschienen in der Hämolymphe weitere neue Polypeptide: 170 K, 147 K, 129 K, 72 K und 48 K.

Zur Ergänzung der sich aus dem Muster der Hämolymphpolypeptide ergebenden Erkenntnisse, wurden die Gele fluorographisch ausgewertet (Abb. 22). Dabei fiel auf, daß die Gesamtinkorporation des Tracers in Hämolymphproteine von L5-Larven niedriger als bei den Puppen des Stadiums P 3 war. Bei P 6-Puppen war die Synthese dagegen wieder deutlich zurückgegangen und nur wenige Banden waren sichtbar. Am niedrigsten war die Inkorporation bei pharat Adulten (P 14), bei denen Proteinsynthese nur in Spuren nachweisbar war. Die Markierung der Banden nahm dann innerhalb weniger Stunden bis zur Imaginalhäutung stark zu. Ihr Maximum erreichte sie bei eierlegenden Königinnen, wenn man berücksichtigt, daß nur 0,5 µl Hämolymphe aufgetragen wurden. Die schwache Markierung der Larven-Polypeptide gegenüber dem Puppenstadium P 3 dürfte zumindest teilweise auf den Konzentrationseffekt der Hämolymphe zurückzuführen sein, da man bei L5-Larven etwa 60 - 80 µl Hämolymphe gewinnen konnte, bei Puppen der Stadien P 3 und P 6 dagegen höchstens 1/6 dieser Menge.

Im Einzelnen ergab sich, daß die Hauptbanden der larvalen Hämolymphe auch am stärksten bei Larven und Puppen (P 3 und P 6) markiert waren. Nur das Polypeptid mit dem MW von 72,5 K wurde schon in der späten L 5-Larve

nicht mehr synthetisiert, obwohl es bis zur jungen Imago in der Hämolymphe nachgewiesen werden konnte. Das Polypeptid von 108 K wurde vor allem in der Larve synthetisiert, später nicht mehr. Es konnte auch schon bei pharat Adulten des Stadiums P 14 nicht mehr nachgewiesen werden. Zwei Hauptbanden, 237 K und 81 K, wurden sowohl in der L 5 als auch relativ zu den anderen Banden besonders stark in P 3 und P 6 synthetisiert, auch wenn die Syntheseaktivität insgesamt in Stadium P 6 schon erheblich zurückgegangen war. Beide Polypeptide hatten im Stadium P 14 noch einen hohen Titer, wurden aber nicht mehr synthetisiert. Diejenigen larvalen Hauptbanden und vielen niedermolekularen Banden, die in Stadium P 6 nicht mehr oder nur in verschwindendem Maß synthetisiert worden waren, traten im Stadium P 14 offenbar als Folge ihrer nur noch geringen Synthese nicht mehr auf.

Bei pharat Adulten des Stadiums P 14, d.h. ca 5 h vor der Imaginalhäutung, ließ sich mit der Fluorographie erstmals die wenn auch schwache Synthese imaginaler Polypeptide nachweisen [1]. Die Markierung der Hämolymphpolypeptide stieg dann in den wenigen Stunden bis zur Imaginalhäutung stark an. Die Neusynthese umfaßte neben dem Vitellogenin drei weitere spezifisch imaginale Polypeptide (147 K, 129 K und 55 K) sowie das Polypeptid von 237 K, das zumindest seinem Molekulargewicht nach schon in der Larve und Puppe vorgekommen war. Von ihnen waren die Polypeptide von 147 K und 129 K als Proteinbanden mit der Coomassie Blue-Färbung noch nicht sichtbar.

Das bedeutete, daß die Synthese von Hämolymphproteinen kurz vor der Imaginalhäutung wieder beginnt - und bestätigte die mit anderen Methoden schon zuvor gewonnenen Erkenntnisse. Bei den eierlegenden Königinnen kamen weitere markierte Polypeptide vor: 151 K, 81 K und 76 K.

[1] Ergänzende Versuche, auch bei den jüngeren Stadien P 11 und 12 Syntheseaktivität imaginaler Polypeptide nachzuweisen, scheiterten. Sie sind deshalb nicht gesondert wiedergegeben. Bedingt durch den Farbquench und die niedrige Energie der ß-Teilchen ist die Zählausbeute der Fluorographie gering und es bedarf höherer spezifischer Aktivität oberhalb eines Schwellenwertes bezogen auf eine bestimmte Gelfläche (500 dpm/ 1 x 0,1 cm für eine Woche Exposition), ehe der Film geschwärzt wird (BONNER und LASKEY, 1974).

5. Vergleich der Hämolymphprotein- und Vitellogeninsynthese bei Königinnen, Arbeiterinnen und Drohnen

Die Hämolymphprotein- und Vitellogenin-Synthese bei eierlegenden Königinnen, 7 d alten Arbeiterinnen vom Brutnest und 0 d sowie 7 d alten Drohnen wurde nach den unter II.3.6. und 3.7. beschriebenen Methoden mit $^{3}$H-Leucin als Tracer ermittelt (Abb. 23). Die Hämolymphprotein-Synthese war bei den Königinnen deutlich am höchsten, nämlich sechsmal höher als bei den Arbeiterinnen sowie zehnmal höher als bei den 7 d alten Drohnen. Die Inkorporation in Hämolymphproteine 0 d alter Drohnen betrug nur 1,8% der eierlegender Königinnen.

Noch deutlicher war der Unterschied bei der Vitellogenin-Synthese: Das Verhältnis der Vitellogenin-Synthese von eierlegenden Königinnen zu 7 d alten Arbeiterinnen betrug 20:1. Auch bei den 7 d alten Drohnen konnte Vitellogenin-Synthese nachgewiesen werden - allerdings betrug sie nur etwa 1% der eierlegender Königinnen. Die relativen Anteile der Vitellogenin-Markierung an der Markierung aller Hämolymphproteine betrug im Mittel bei eierlegenden Königinnen 84,6 %, bei den untersuchten Arbeiterinnen 25,1 % und bei den 7 d alten Drohnen 10,2 %. Bei frisch geschlüpften Drohnen konnte Vitellogenin-Synthese nicht nachgewiesen werden. Die Cycloheximid-behandelten 7 d alten Arbeiterinnen inkorporierten bei beiden Assays kein $^{3}$H-Leucin.

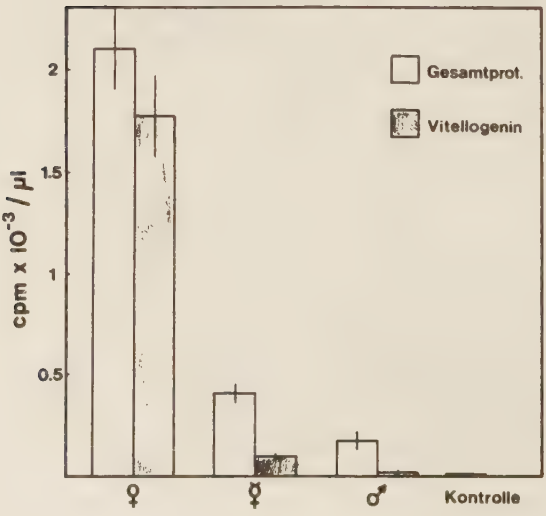



Abb. 23

Tracer-Inkorporation in Gesamthämolymphproteine und Vitellogenin bei Königinnen, Arbeiterinnen und Drohnen

$^{3}$H-Leucin-Injektion von 2 µCi/Tier, 75 min Inkubation. Wiedergegeben sind: eierlegende Königinnen, 7 d alte Arbeiterinnen, 7 d alte Drohnen und Cycloheximid-Kontrollen (Arbeiterinnen, 7d) n = 5

## 6. Kontrolle der Initiation der Vitellogenin-Synthese

Nachdem der genaue Zeitpunkt der Initiation der Vitellogenin-Synthese, ihr Verlauf in der Ontogenese und der Hormontiter der Königinnen bekannt war, konnte die Rolle von Hormonen - insbesondere die des Juvenilhormons - für die Expression des Vitellogenins mit klassischen physiologischen Methoden wie Allatektomie und Dekapitierung sowie der Applikation von Juvenilhormon gezielt näher untersucht werden.

Die zugehörigen Serien von Experimenten sind in Abbildung 24 zur Übersicht zusammengefaßt.

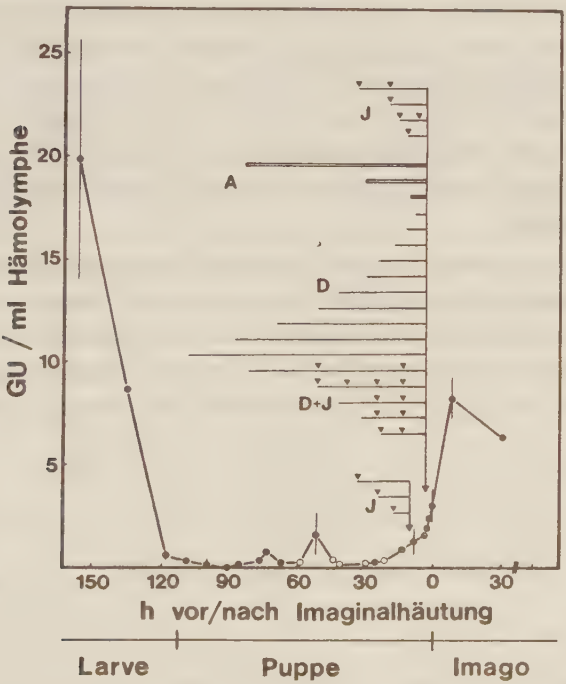



Abb. 24 Übersicht über die Versuchserien zur Kontrolle der Initiation der Vitellogenin-Synthese bei Königinnen.

Alle Experimente wurden an pharat adulten Königinnen vorgenommen. Zur Orientierung ist der Verlauf des JH-Titers in der Metamorphose wiedergegeben. Senkrechte Linien weisen auf den Zeitpunkt der Tracer-Injektion. Die waagerechten Linien in der Grafik geben die Dauer von der jeweiligen Behandlung (J = Juvenilhormon-Applikation, ▼ = genauer Zeitpunkt der Applikation; D = Dekapitierung; A = Allatektomie) bis zur Injektion wieder.

In Vorversuchen stellte sich heraus, daß jeder operative Eingriff an pharat Adulten die Imaginalhäutung verhinderte, selbst wenn sie nur noch etwa 3 h vor der Imaginalhäutung standen. Die Königinnen verharrten in ihrer Puppenhaut. Z.T. härtete sich die Cuticula, und die Tiere reagierten noch bis zu 10 h lang auf mechanische Reizung, bevor sie starben. Auch Scheinoperierte, denen unter $N_2$-Narkose nur die Kopfkapsel geöffnet wurde, häuteten sich nicht mehr. Dagegen verhinderte die Narkose allein die Imaginalhäutung nicht. Lediglich in Fällen, bei denen pharat Adulte des Stadiums P 15 operiert wurden, erwies sich die Imaginalhäutung als nicht gehemmt. Dies bedeutete experimentell eine enorme Einschränkung, da nur Untersuchungen an Puppen vorgenommen und der weitere Lebensweg operierter Königinnen nicht verfolgt werden konnte. Über die zugrundeliegenden Ursachen kann nur spekuliert werden. Z.B. könnte der präzise ablaufende Häutungsprozeß gestört worden sein, wenn die Verwundung früher als 3 h vor der prospektiven Imaginalhäutung erfolgte, weil das für die Häutung verantwortliche Eclosionshormon verwundungsbedingt nicht mehr ausgeschüttet wurde. Oder durch die Verwundung freigesetzte unbekannte Faktoren unterbanden die Imaginalhäutung.

Aus diesem Grunde wurden alle Puppen der nachfolgend beschriebenen Versuchsserien, ob operiert oder nicht, im Stadium P 14 mit $^3$H-Leucin injiziert und ihre Proteinsyntheseaktivitäten bestimmt (wenn nicht anders angegeben). In diesem Stadium wird Vitellogenin bei unbehandelten Königinnen schon synthetisiert und beträgt 40 - 50 % der Synthese aller Hämolymphproteine (vgl. III.4.2.).

## 6.1. Allatektomie und Dekapitierung von Königinnenpuppen

### 6.1.1. Allatektomie

Weil die Allatektomie eine sehr zeitaufwendige Operation ist, wurde sie nur an einigen ausgewählten Puppenstadien vorgenommen:

- bei solchen Puppen, bei denen die Vitellogenin-Synthese schon begonnen hatte (Stadium P 12)
- bei Puppen kurz vor dem ersten Auftreten von Vitellogenin (Stadium P 10)
- und bei Puppen des Stadiums P 3, kurz bevor JH-Aktivität in der Hämolymphe nachzuweisen war.

Hämolymphprotein- und Vitellogenin-Synthese differierten bei den pharat Adulten (P12), bei denen Vitellogenin schon in der Hämolymphe vorkam, graduell, aber nicht statistisch signifikant (U-Test, p = 0,05) zwischen unbehandelten Kontrollen und den allatektomierten Königinnenpuppen (Tab. 17a). Die Allatektomie machte sich in der kurzen Zeit von 6 - 8 h nach der Operation auch qualitativ nicht bemerkbar, denn die relativen Anteile der Vitellogenin-Synthese an der Gesamtsynthese von Hämolymphproteinen entsprachen sich. Bei den Allatektomierten konnte allerdings nur etwa ein Drittel bis die Hälfte des Hämolymphvolumens gewonnen werden, das man bei den Kontrollen erhielt. Dieser Verlust an Hämolymphe ist wahrscheinlich auf die Operation zurückzuführen. Er könnte eine verringerte Syntheseleistung der operierten Königinnen verschleiert haben.

Wenn Puppen zu einem Zeitpunkt allatektomiert wurden, an dem noch keine Synthese von Vitellogenin nachweisbar war (P10), ließ sich später im Stadium P 14 trotzdem Vitellogenin-Synthese nachweisen (Tab. 17b). Die operierten Puppen entwickelten sich - zumindest was die Kriterien Augen- und Thorax-Pigmentierung betraf - ebenso schnell wie die Kontrollen. Die Markierung von Vitellogenin war bei allatektomierten und scheinoperierten Puppen niedriger als bei den Kontrollen, ohne sich im U-Test (p = 0,05) statistisch signifikant zu unterscheiden. Auffällig war die statistisch signifikante Erhöhung der Proteinsynthese bei Scheinoperierten gegenüber Kontrollen und Allatektomierten. Für eine Diskussion dieser Befunde sei

Tab. 17 Auswirkungen der Allatektomie auf die Synthese aller Hämolymphproteine und Vitellogenin von Königinnenpuppen

| Versuchsgruppe | | n | Tracer-Inkorporation (cpm) in alle Hämolymphproteine $\bar{x}$ | s | Vitellogenin $\bar{x}$ | s | %VG[1] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a. | Kontrolle | 3 | 98,7 | 34,6 | 41,9 | 12,1 | 42,5 |
| | Allatektomie in Stadium P 12 | 4 | 79,4 | 27,0 | 25,8 | 14,2 | 32,5 |
| b. | Kontrolle | 3 | 139,9 | 19,9 | 46,1 | 12,9 | 33,0 |
| | Schein-Operation | 3 | 297,1 | 102,2 | 22,1 | 12,7 | 7,4 |
| | Allatektomie in Stadium P 10 | 4 | 114,1 | 68,0 | 29,2 | 10,1 | 25,6 |
| c. | Kontrolle | | w i e u n t e r a. | | | | |
| | Allatektomie in Stadium P 3 | 5 | 94,7 | 32,4 | 17,3 | 8,3 | 18,3 |

[1] relativer Anteil der Tracer-Inkorporation in Vitellogenin an der Gesamtinkorporation in Hämolymphproteine

darauf hingewiesen, daß auch in diesem Teilexperiment nur die Hälfte des erhaltenen Hämolymphvolumens der Kontrollen bei den Operierten gewonnen werden konnte.

Schließlich wurden Puppen operiert, deren Augen sich gerade rosa färbten, die also noch durchschnittlich 81 h bis zur Imaginalhäutung gebraucht hätten, und bei denen wenige Stunden später in der Normalentwicklung ein kleiner JH-Aktivitätspeak erwartet werden konnte. Von den insgesamt 9 operierten Puppen dieses Stadiums überlebten 5, d.h. etwas mehr als 50 %. Diese allatektomierten Puppen entwickelten sich nicht schneller als die unbehandelten Kontrollen, ihre Entwicklung verzögerte sich eher um einige Stunden ( < 5 h) Dabei blieb die in der Normogenese beobachtete Abfolge sich verändernder äußerer morphologischer Charakteristika weitgehend erhalten. Allerdings wurde der Thorax aller operierten nie dunkler als sepiabraun (RAL 8014), so daß eine Beteiligung von JH an der Melanisierung der Cuticula nicht ausgeschlossen werden kann. Allatektomierte und Kontrollköniginnen unterschieden sich dagegen deutlich in einem Punkt: Die Exuvialflüssigkeit wurde bei den Operierten im Gegensatz zu den Kontrollen kurz vor der Imaginalhäutung nicht resorbiert. Mit dem RIA konnte Vitellogenin in der Hämolymphe aller Tiere nachgewiesen werden (Tab. 17c). Seine Synthese war aber statistisch signifikant niedriger als die der Kontrollen (U-Test, $p = 0{,}05$). Zusammenfassend heißt dies, daß Vitellogenin auch ohne Corpora allata synthetisiert wird.

### 6.1.2. Dekapitierung

Insgesamt wurden 83 Königinnenpuppen zehn verschiedener Entwicklungsstadien dekapitiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefaßt. Generell konnte die Entwicklung der Puppen wie schon bei den Allatektomierten nicht unterbunden werden, wenn man die äußeren morphologischen Charakteristika betrachtet. Selbst die jüngsten dekapitierten Stadien, von denen drei Puppen schon 6 h nach der Puppenhäutung dekapitiert wurden, entwickelten sich im gleichen zeitlichen Rahmen wie die unbehandelten Kontrollköniginnen. In einigen Fällen waren Entwicklungsverzögerungen zu beobachten, die sich aber im Bereich weniger Stunden und nicht außerhalb der beobachteten natürlichen Variabilität des beobachteten Entwicklungsabschnitts (vgl. III.1.) bewegten. Größere Stichproben ($n > 100$) hätten möglicherweise Verteilungsunterschiede der Entwicklungszeiten zwischen Kontrolle und Operierten zutage gefördert. Früher als 56 h vor der Imaginalhäutung dekapitierte

Tiere resorbierten die Exuvialflüssigkeit kurz vor der Imaginalhäutung nicht. Die Pigmentierung der Cuticula blieb bei den Dekapitierten wie bei den Allatektomierten im Stadium P 14 stehen. Daß alle Puppen - operiert oder nicht - auf mechanische Reizung etwa ab dem Stadium P 12 deutlich reagierten, kann als ein weiteres Indiz dafür gelten, daß die Entwicklung von Puppen, zumindest teilweise, auch ohne Kopf vonstatten geht. Diese Reaktion war außerdem als wichtiges Lebenszeichen Voraussetzung für die Tracerinjektion.

Je früher Puppen dekapitiert wurden, desto eher traten auch durch die Operation bedingte Ausfälle auf. Sie waren im Stadium P 3 mit 15% am höchsten. Dies ist weniger als bei den allatektomierten Königinnen und wohl darin begründet, daß der Eingriff selber sehr kurz war. Parallel dazu nahm die Zahl der Puppen zu, bei denen nach der $^{3}$H-Leucin-Injektion keine Hämolymphprotein-Synthese nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Trend nur die Gruppe des Stadiums P 10: Fast 50 % aller Versuchstiere hatten weder nachweisbare Vitellogenin- noch Hämolymphprotein-Synthese.

Hämolymphprotein- wie auch Vitellogenin-Synthese schwankten sowohl bei den unbehandelten wie auch bei den dekapitierten pharat Adulten individuell sehr stark und führten nicht selten zu Standardabweichungen von über 50%. Eine Ursache liegt wohl darin, daß die Syntheseaktivität des Fettkörpers innerhalb weniger Stunden vor der Imaginalhäutung drastisch ansteigt (vgl. III.4.2.). Außerdem ermöglichte die Pigmentierung des Thorax zwar relativ genaue Altersbestimmungen, aber eine Ungenauigkeit von 1,5 h mußte schon mehr als 100 % unterschiedlichen Markierungsindizes führen. Trotzdem ließ sich feststellen, daß - egal zu welchem Entwicklungszeitpunkt dekapitiert wurde - im Stadium P 14 Hämolymphproteine synthetisiert wurden und überraschend in allen Versuchsgruppen mit dem Vitellogenin-spezifischen Antikörper mit der indirekten Immunopräzipitation markierte Hämolymph-Proteine präzipitiert werden konnten. Mit einer Ausnahme: Puppen, die noch weißäugig oder zu einem Zeitpunkt dekapitiert wurden, an dem sich die Augen gerade zu verfärben begannen (Daten nicht aufgeführt), entwickelten sich zwar nach den äußerlichen morphologischen Charakteristika "normal", sie bewegten sich auch auf mechanische Reize hin, aber sie synthetisierten keine Hämolymphproteine - zumindest war keine Markierung von Hämolymphproteinen meßbar.

Tab. 18 Auswirkungen der Dekapitierung auf die Synthese aller Hämolymphproteine und Vitellogenin von Königinnenpuppen

| Dekapitiert im Puppenstadium | Durchschnittliche Dauer bis zur Imaginalhäutung | Dauer von Dekapitierung bis Injektion | OP | † | PS=0* | n | Tracer-Inkorporation (cpm) in alle Hämolymphproteine $\bar{x}$ | alle Hämolymphproteine s | Vitellogenin $\bar{x}$ | Vitellogenin s | %VG [1] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P 13 | 7,5 | 4 | 3 | - | - | 3 | 55,0 | 26,2 | 23,0 | 10,6 | 41,8 |
| P 12 | 10,5 | 8-11 | 4 | - | - | 4 | 98,5 | 65,2 | 24,8 | 14,5 | 25,2 |
| P 11-12 | 15 | 14-15 | 4 | - | 1 | 3 | 54,0 | 17,3 | 14,7 | 5,9 | 27,2 |
| P 11 | 21 | 22-24 | 4 | - | 1 | 3 | 145,0 | 83,4 | 35,7 | 17,1 | 24,4 |
| P 10 | 26 | 26-31 | 9 | - | 4 | 5 | 192,8 | 175,3 | 35,0 | 31,5 | 18,2 |
| P 9 | 37 | 36-41 | 6 | 1 | 1 | 4 | 57,5 | 32,6 | 12,3 | 6,7 | 21,4 |
| P 7 | 49 | 44-51 | 8 | 1 | 1 | 6 | 149,6 | 123,9 | 16,9 | 13,7 | 11,3 |
| P 5 | 64 | 59-64 | 10 | - | 4 | 6 | 76,3 | 48,4 | 12,9 | 8,3 | 16,9 |
| P 3 | 81 | 72-85 | 26 | 4 | 10 | 12 | 83,2 | 47,8 | 20,0 | 16,2 | 24,0 |
| P 1 | 101 | 90-111 | 9 | - | 9 | 9 | 0,0 | | 0,0 | | |
| Kontrolle, unbehandelt | | | - | - | - | 11 | 118,9 | 60,8 | 47,9 | 25,4 | 40,3 |

* Normal entwickelt, aber keine Hämolymphproteinsynthese (PS)

[1] relativer Anteil der Tracer-Inkorporation in Vitellogenin an der Gesamtinkorporation in Hämolymphproteine

Wegen der großen individuellen Schwankungen lassen sich bezüglich der Vitellogenin-Synthese zwischen den Gruppen keine statistischen Unterschiede (U-Test für $n < 5$, t-Test für $n > 5$, $p = 0{,}05$) feststellen. Zahlenmäßig war die VG-Antiserum präzipitierte Radioaktivität der Dekapitierten etwa um die Hälfte niedriger als die der Kontrolle. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang auch, daß der relative Anteil der Vitellogeninsynthese an der Synthese aller Hämolymphproteine bei den Kontrollen 40,3 % und bei den dekapitierten Königinnen nur zwischen 17 und 27 % ausmachte. Wiederum mit einer Ausnahme: Bei nur 4 h vor der Injektion dekapitierten pharat Adulten des Stadiums P 13 erreichte die Vitellogenin-Synthese 41,8 %. Möglicherweise wirkte sich die Dekapitierung - wie die Allatektomie - nicht mehr auf die Vitellogenin-Synthese aus, wenngleich Stichprobenumfang und die geringe absolut gemessene inkorporierte Radioaktivität die Aussagekraft dieses Ergebnisses abschwächen.

Die Synthese aller Hämolymphproteine unterschied sich, mit einer Ausnahme zwischen den untersuchten Versuchsgruppen nicht. Der einzig signifikante Unterschied (U-Test, $p = 0{,}05$) ergab sich zwischen den Versuchsgruppen, deren Puppen 15 bzw. 21 h vor der voraussichtlichen Imaginalhäutung dekapitiert wurden. Doch lagen bedingt durch die Ausfälle nur drei Tiere pro Gruppe vor.

Zusammengefaßt: Die an allatektomierten Puppen gewonnenen Daten entsprechen qualitativ und quantitativ weitgehend denen der dekapitierten. Da die Vitellogenin-Synthese in beiden Kontrollgruppen höher lag, beeinträchtigt der operative Eingriff die Vitellogenin-Synthese offensichtlich in ihrer Quantität, ohne ihre Expression zu unterbinden.

### 6.2. JH-Behandlung dekapitierter Königinnenpuppen

Zwei Annahmen waren nach den Ergebnissen der Experimente an allatektomierten und dekapitierten Königinnen naheliegend. Entweder war das Fehlen von JH dafür verantwortlich, daß ihre Vitellogenin-Synthese quantitativ das Niveau der unbehandelten Kontrollen nicht erreichte, oder andere Faktoren, wie z.B. der Verwundungseffekt selbst, hatten dies bewirkt. Mit Hilfe von JH-Applikationen auf dekapitierte Königinnenpuppen verschiedener Entwicklungsstadien sollte die erste Annahme überprüft werden. Dazu wurden ältere Puppen 12 und 24 h, sowie jüngere 48 (+ 36)h vor der $^{3}$H-Leucin-Injektion mit 1 µg JH III/Behandlungszeit und Tier behandelt. Etwa 48 h vor der Imaginalhäutung war im übrigen auch ein kleiner Peak von JH-Aktivität im Galleria-Test nachgewiesen worden (vgl. III.2.1.).

Die Entwicklungsdauer der dekapitierten Puppen veränderte sich durch die JH-Applikation nicht. Auch wurde die mangelhafte Resorption der Exuvialflüssigkeit durch JH-Applikation nicht behoben. Hämolymphprotein- und Vitellogenin-Synthese variierten innerhalb weiter Grenzen (Tab. 19), und die niedrige Tracerinkorporation in Vitellogenin dekapitierter Puppen konnte in keinem Fall durch Juvenilhormon gesteigert werden. Sie blieb um etwa die Hälfte niedriger als bei den nur mit reinem Aceton behandelten Nullkontrollen, die sich ihrerseits von den zuvor beschriebenen Werten unbehandelter Puppen (vgl. III.4.2.) nicht unterschieden. Die einzig signifikanten Unterschiede (U-Test, $p = 0,05$) ergaben sich bei den Hämolymphprotein-Synthesen zwischen den Nullkontrollen und den JH-behandelten Puppen, die im Stadium P 3 dekapitiert wurden, und bei der Vitellogenin-Synthese zwischen der Nullkontrolle einerseits und den Versuchsgruppen P 3/JH$^-$, P7/JH$^-$, P 7/JH$^+$, P 9/JH$^-$ und P 9/JH$^+$. Dieser Unterschied in der Vitellogenin-Synthese spiegelte sich auch in ihrem relativen Anteil an der Synthese aller Hämolymphproteine wider, der sich bei den Dekapitierten zwischen 14,4 und 31,6 % bewegte, während er bei der Nullkontrolle 43,3 %

Tab. 19 Einfluß der JH-Behandlung auf die Synthese aller Hämolymphproteine und Vitellogenin von dekapitierten Königinnenpuppen

| Dekapitiert im Puppenstadium | JH-Behandlung (h vor Tracer-Injektion) | n | Tracer-Inkorporation (cpm) in alle Hämolymphproteine $\bar{x}$ | s | Vitellogenin $\bar{x}$ | s | %VG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P 3 | 49/11 | 7 | 45,9 | 18,3 | 14,5 | 5,4 | 31,6 |
| P 3 | - | 7 | 59,8 | 30,5 | 18,3 | 15,0 | 30,6 |
| P 7 | 47/36/24/12 | 4 | 112,9 | 42,7 | 18,0 | 12,2 | 15,9 |
| P 7 | - | 4 | 77,4 | 38,2 | 18,5 | 15,3 | 23,9 |
| P 9 | 23/8-11 | 4 | 75,5 | 27,6 | 15,6 | 7,2 | 20,7 |
| P 9 | - | 4 | 57,5 | 32,6 | 12,3 | 6,7 | 21,4** |
| P 10 | 25-27/12 | 4 | 97,3 | 29,7 | 24,4 | 9,8 | 25,1 |
| P 10 | - | 4 | 132,7 | 61,3 | 20,3 | 8,9 | 15,3 |
| P 11 | 23/12 | 4 | 136,0 | 58,4 | 19,6 | 8,3 | 14,4 |
| P 11 | - | 4 | 105,3 | 41,2 | 25,7 | 17,1 | 24,4 |
| Nullkontrolle (Aceton) | - | 4 | 91,9 | 21,3 | 39,8 | 14,6 | 43,3 |

* relativer Anteil der Tracer-Inkorporation in Vitellogenin an der Gesamtinkorporation in Hämolymphproteine

** gleiche Daten wie in Tabelle 18

betrug. D.h. zusammengefaßt, daß Juvenilhormon unter den hier gewählten Bedingungen die Vitellogenin-Synthese nicht auf das Niveau der Kontrollen steigert. Sein Fehlen verursacht daher wahrscheinlich nicht bzw. nicht allein die verringerte Syntheseleistung des Fettkörpers.

### 6.3. JH-Behandlung von Königinnenpuppen

Da Vitellogenin, wie zuvor geschildert, auch bei allatektomierten und dekapitierten pharat Adulten produziert wurde und appliziertes Juvenilhormon unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht in der Lage war, Protein- und Vitellogenin-Synthese auf das Niveau der unoperierten Kontrollen zu steigern, wurde in einem dritten Ansatz versucht, die Synthese der Hämolymphproteine durch JH-Applikation von nichtoperierten Puppen zu beeinflussen. Denn die beobachtete zeitliche Koinzidenz zwischen JH- und Vitellogenin-Produktion in der Königinnen-Entwicklung ließen einen physiologischen Zusammenhang vermuten.

In einer ersten Experimentalserie wurden Puppen je 1x 8 und 12 bzw. je 2x 16 + 4 sowie 36 + 16 h vor der Tracerinjektion im Stadium P 14, d.h. ca. 3 - 5 h vor der Imaginalhäutung, mit je 1 µg JH III (gelöst in Aceton)

Tab. 20 Einfluß von Juvenilhormon auf die Synthese aller Hämolymphproteine und Vitellogenin von Königinnenpuppen *

| | JH-Behandlung (h vor Tracer-Injektion) | n | Tracer-Inkorporation (cpm) in alle Hämolymphproteine $\bar{x}$ | s | Vitellogenin $\bar{x}$ | s | %VG** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a. | 8 | 4 | 114,0 | 52,7 | 44,8 | 19,3 | 39,3 |
| | 12 | 4 | 125,3 | 44,6 | 45,9 | 22,1 | 36,6 |
| | 16+4 | 3 | 97,6 | 36,9 | 35,7 | 18,4 | 36,6 |
| | 30+16 | 4 | 133,0 | 25,5 | 42,5 | 6,4 | 32,0 |
| | Nullkontrolle (Aceton) | 6 | 129,8 | 54,9 | 56,4 | 21,5 | 43,5 |
| b. | 6-8 | 5 | 125,3 | 22,9 | 13,4 | 7,6 | 10,9 |
| | 12-16 | 5 | 126,3 | 66,7 | 14,9 | 6,6 | 11,8 |
| | 23 | 5 | 190,0 | 52,4 | 45,6 | 20,1 | 24,0 |
| | Nullkontrolle (Aceton) | 4 | 98,0 | 36,9 | 19,5 | 12,5 | 20,9 |

* a. JH-Behandlung topikal-abdominal (1µg JH III/Zeitpunkt), $^3$H-Leucin-Injektion in Puppenstadium P 14
b. Einmalige JH-Behandlung topikal-abdominal (10 µg JH III), $^3$H-Leucin-Injektion in Puppenstadium P 12

** relativer Anteil der Tracer-Inkorporation in Vitellogenin an der Gesamtinkorporation in alle Hämolymphproteine

topikal behandelt. Weder die Synthese aller Hämolymphproteine zusammen noch des Vitellogenins allein wurde durch die Applikation statistisch signifikant (U-Test, p = 0,05) verändert (Tab. 20a). Auch der prozentuale Anteil der Tracerinkorporation in Vitellogenin blieb nahezu konstant. Die Synthese der mit reinem Aceton behandelten Nullkontrollen bewegte sich im Übrigen im Rahmen der bei unbehandelten Königinnenpuppen gleichen Alters bestimmten Werte.

Deshalb wurde der Injektionszeitpunkt für den Tracer in einer zweiten Serie von Experimenten in das Puppenstadium P 12 vorverlegt und die applizierte Dosis auf 10 µg JH III pro Puppe erhöht. Im Stadium P 12 war in der Normogenese bei allen untersuchten Königinnen erstmals Vitellogenin produziert worden (vgl. III.4.2.).Dies traf auch für die 6 - 8 h, 12 - 16 h bzw. 23 h vor der Leucin-Injektion JH-behandelten Puppen sowie für die Nullkontrollen zu (Tab. 20b). Doch fiel auf, daß Vitellogenin und Gesamthämolymphprotein-Synthese bei den 23 h zuvor mit JH III behandelten Gruppen um das Doppelte angestiegen waren. Nur die Synthese aller Hämolymphproteine dieser Gruppe unterschied sich signifikant von allen anderen (U-Test, p = 0,05). Alle anderen Versuchsgruppen, d.h. auch diejenigen, die für kurze Zeit exogenem JH ausgesetzt waren, unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Der relative Anteil der Vitellogenin-Synthese blieb jedoch in allen Versuchsgruppen dieser Serie größenordnungsmäßig gleich. Offenbar übt Juvenilhormon nur nach längerer Expositionszeit eine Synthese-stimulierende Wirkung aus.

### 6.4. Juvenilhormon-Gehalt der Hämolymphe dekapitierter und allatektomierter Königinnenpuppen

Nachdem die Experimente an allatektomierten und dekapitierten Königinnenpuppen zu belegen schienen, daß JH für die Expression des Vitellogenins nicht essentiell ist, wurde abschließend der Juvenilhormon-Gehalt der Hämolymphe dekapitierter und allatektomierter Entwicklungsstadien untersucht, um einerseits die theoretische Möglichkeit auszuschließen, daß das JH der Königinnenpuppen von einer anderen Quelle als von den Corpora allata stammt, und andererseits den Erfolg der operativen Eingriffe zu kontrollieren.

Es wurden zwei Stadien ausgewählt, bei denen keine (P 3) bzw. wenig (P 11-12) Juvenilhormon-Aktivität während der Puppen-Normalentwicklung nachgewiesen werden konnte (vgl. III.2.1.). Die Puppen wurden dekapitiert bzw. allatektomiert und dann zu den Entwicklungszeiten präpariert, an denen in der Normogenese JH-Peaks nachgewiesen worden waren. Unbehandelte gleichalte Puppen dienten als Kontrolle - zum einen für die Entwicklung der Puppen, zum anderen für die JH-Bestimmung.

Juvenilhormonaktivität konnte bei keiner der Gruppen dekapitierter bzw. allatektomierter Königinnenpuppen nachgewiesen werden (Tab. 21). Keine JH-Aktivität im Galleria-Wachs-Test bedeutet jedoch nicht, daß die extrahierte Hämolymphe überhaupt kein Juvenilhormon enthält, sondern kann ebenso bedeuten, das die JH-Konzentration lediglich unter der Nachweisgrenze des Tests liegt. Die Nachweisgrenze ergibt sich aus Verdünnung der Extraktionsprobe und der Reaktivität der Galleria-Puppen. Da die positive Reaktivität der Puppen (vgl. Eichkurve, III.2.1.) innerhalb von zwei Verdünnungsstufen von 50 auf 0 % sinkt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei einer Extraktion aus dem vierfachen Hämolymphvolumen einer im Galleria-Test nicht aktiven Probe eine positive Reaktion resultiert hätte. 0,5 GU pro Extraktionsprobe multipliziert mit den mg Paraffin, in dem der Extrakt gelöst ist, und dem Quotienten von 1 ml Hämolymphe und dem extrahierten Hämolymphvolumen (ml) ergibt diejenige Konzentration (GU/ml), die im Galleria-Test gerade nicht mehr nachzuweisen ist. Diese Konzentration wurde für alle Gruppen dekapitierter und allatektomierter Königinnen errechnet und in der letzten Spalte der Tabelle 21 aufgeführt.

Tab. 21 Juvenilhormon-Gehalt dekapitierter und allatektomierter Königinnenpuppen

| Versuchsgruppe * Behandlung/Stadium | n | Präparation der Hämolymphe im Stadium | µl | Juvenilhormon-Gehalt GU/Probe | GU/ml $\bar{x}$ | GU/ml s |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Allatektomie | | | | | | |
| P 3 | 1 | P 6 | 90 | 0 | <412 | |
| P11-12 | 1 | P 14 | 106 | 0 | <350 | |
| Dekapitierung | | | | | | |
| P 3 | 1 | P 6 | 100 | 0 | <371 | |
| P 3 | 1 | P 14 | 77 | 0 | <482 | |
| P11-12 | 1 | P 14 | 120 | o | <309 | |
| unbehandelte Kontrollen | | | | | | |
| | 3 | P 6 | 40/41/150 | | 1639 | 931 |
| | 3 | P 14 | 50/55/92 | | 1845 | 958 |

* Für jede Versuchsgruppe wurde die Hämolymphe mehrerer gleichbehandelter Puppen gepoolt, da pro Tier nur etwa 7-10 µl erhalten werden konnten.

Demnach sank der JH-Titer bei den operierten Puppen auf weniger als 482 GU/ml und lag damit um mindestens das vierfache niedriger als bei den unbehandelten Kontrollen. Offenbar gibt es keinen anderen Syntheseort für JH bei Königinnenpuppen als die Corpora allata und beide angewendeten Operationsverfahren verhindern, daß JH gebildet wird.

Auch das bei den Operationen zum Wundverschluß verwendete Dentalwachs wurde an Galleria-Puppen auf seine Juvenilhormon-Aktivität hin überprüft. Da an 25 operierten Puppen keine positive Reaktion beobachtet werden konnte, läßt sich eine vom Dentalwachs ausgehende juvenoide Wirkung ausschließen.

7. Allatektomie von Jungköniginnen

Gerade erst geschlüpfte Jungköniginnen wurden in einem ergänzenden Experiment allatektomiert, um zu überprüfen, wie sich das Fehlen der Corpora allata auf die Eiablage auswirkt. Zugleich diente dieses Experiment als erste Erfolgskontrolle für die weitaus schwierigere Allatektomie an Puppen (s.a. III.6.).

Alle Königinnen überlebten die Operation und die später folgende $CO_2$-Begasung. Erst dann, als der Käfig in den Kleinvölkern geöffnet wurde, um die Königinnen einzuweiseln, traten starke Verluste auf. Während die nichtoperierten Kontrollköniginnen zu 80 % angenommen wurden, mußte bei den operierten Königinnen - unabhängig davon, ob scheinoperiert oder allatektomiert - ein Verlust von ca 60 % in Kauf genommen werden, der wohl nicht auf direkte Operationseinwirkungen zurückzuführen sein dürfte, sondern vielmehr auf Funktionsstörungen oder Verwundungen der Königinnen, die von den Arbeiterinnen perzipiert und nicht akzeptiert wurden. Alle vom Volk angenommenen Königinnen begannen, Eier zu legen - wenn auch in unterschiedlicher Rate - einmal mehr bestätigend, daß Oogenese und Oviposition bei Bienenköniginnen JH-unabhängig sind. Aus den Eiern schlüpften Larven, die zu lebensfähigen Drohnen heranwuchsen.

| | Jungköniginnen : allatektomiert | scheinoperiert | unbehandelt |
|---|---|---|---|
| n | 9 | 5 | 5 |
| operiert | 9 | 5 | - |
| Operation überlebt | 9 | 5 | - |
| $CO_2$-Begasung | 9 | 5 | 5 |
| lebt 2 d nach Einweiselung | 7 | 4 | 5 |
| lebt 5 d nach Einweiselung | 4 | 2 | 4 |
| in Eilage | 4 | 2 | 4 |

## 8. Entwicklung eines in vitro-Systems für Kurz- und Langzeit-Kultur von Organen der Honigbiene

### 8.1. Entwicklung der Kulturbedingungen in vitro

#### 8.1.1. Fettkörper-Kultur von Bienenarbeiterinnen in vitro

In der ersten Serie von Experimenten mit Fettkörper-Präparationen von Arbeiterinnen wurde das neu entwickelte Honigbienen-Medium mit anderen Medien bezüglich seiner Fähigkeit, die Proteinsynthese in vitro zu fördern, verglichen. Die Inkorporation des $^{3}$H-Leucins im neuen Medium war bis zu dreimal höher als in den anderen Medien (Tab. 22). Das modifizierte Medium von GRACE (1962) war mit 50 % der höchsten Inkorporation das nächstbeste. Die Unterschiede der Tracer-Inkorporation zwischen dem neuen Medium und den Vergleichsmedien sind im U-Test ($p = 0,05$) statistisch signifikant.

Tab. 22

Vergleich des Honigbienen-Mediums mit anderen Medien[1]

| Medium | dpm/Fettkörper-Präparation | s |
|---|---|---|
| Kontrolle Honigbienen-Medium mit 1 mM Cycloheximid | 10.681 | 741 |
| Modifiziertes Medium nach Blomquist et al. (1980) | 137.368 | 2.187 |
| Modifziertes Aedes-Medium nach Bohm et al. (1978) | 160.657 | 19.945 |
| Modifiziertes Grace' Medium (1962) | 226.601 | 8.119 |
| Honigbienen-Medium | 459.282 | 18.447 |

[1] Fettkörper-Präparationen von Bienenarbeiterinnen wurden 30 min lang vorinkubiert und dann 5 h in $^{3}$H-Leucin-haltigem Medium inkubiert.

Beim Vergleich der Proteinsynthese von Fettkörper-Präparationen, die bei 26°C bzw bei 34,5°C für 2 h nach dreistündiger Vorinkubation inkubiert worden waren, stellte sich heraus, daß die Inkorporation bei 34,5°C um

60 % höher war. Diese für Insekten-Organ-Kultur ungewöhnlich hohe Temperatur, die der Temperatur des Brutnestes entspricht, wirkte sich offensichtlich nicht negativ aus.

| Inkubationstemperatur | Tracer-Inkorporation in Arbeiterinnen-Fettkörper in vitro | | |
|---|---|---|---|
| | n | dpm | s |
| 26,5°C | 3 | 109 356 | 9 163 |
| 34,5°C | 3 | 175 600 | 48 406 |
| Kontrolle | 2 | 5 430 | 277 |

Die Einbaurate schwankte in den ersten Experimenten beträchtlich. Es stellte sich heraus, daß sie im Wesentlichen davon abhing, inwieweit das Tracheensystem bei der Präparation intakt geblieben war. Deshalb wurde in der nächsten Serie von Experimenten die Inkorporation von Fettkörper-Präparationen mit bzw. ohne intaktem Tracheensystem verglichen. Beim intakten Traccheensystem wurden die beiden abdominalen Tracheensäcke dorsal geöffnet, so daß sie mit der Umgebungsluft direkt in Verbindung standen, indem ihre hydrophoben Membranen innerhalb der Karkasse auf der Oberfläche des Kultur-Mediums schwammen (Abb. 25). Der benötigte Sauerstoff konnte auf diese Weise über die von den Haupttracheensäcken abführenden Tracheenstämme und das Tracheensystem direkt an die Zielorgane gelangen. Die Prä-

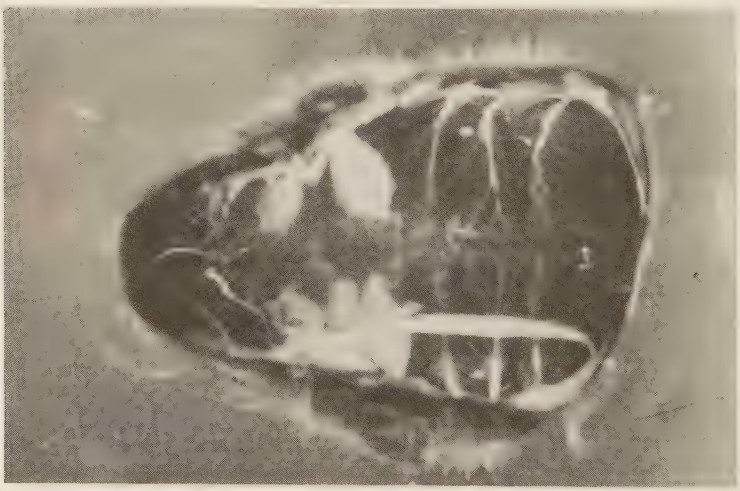


Abb. 25 Fettkörper-Präparation in vitro

Der Fettkörper kleidet die Tergalplatten als dünne Schicht aus. Die offenen Haupttracheensäcke schwimmen auf dem Medium. Arbeiterinnen-Abdominalkarkasse, 20 x vergrößert.

parationen mit intaktem Tracheensystem inkorporierten im Mittel 17 mal mehr $^{3}$H-Leucin in ihre Proteine als diejenigen ohne Tracheen (Tab. 23). Zugleich wurde untersucht, ob die Inkorporation des Tracers dadurch verbessert werden könnte, daß die Fettkörper während der Inkubation von reiner Sauerstoff-Atmosphäre umgeben waren. Diese Erhöhung des Sauerstoff-Partialdrucks wirkte sich bei den Präparationen mit intaktem Tracheensystem nicht signifikant aus (U-Test, p = 0,05). Dagegen wurde der Einbau des Tracers bei den Präparationen ohne Tracheensystem um das 2,8fache gesteigert, wenn sie von reinem Sauerstoff umgeben waren (Tab. 23). Trotzdem blieb er erheblich niedriger als bei allen Präparationen mit Tracheen. Deshalb wurden in allen darauffolgenden Experimenten nur Fettkörper-Präparationen mit - soweit äußerlich erkennbar - intaktem Tracheensystem verwendet.

Tab. 23

Wirkung der Sauerstoffversorgung[1] und von PTU[2] auf die Tracer-Inkorporation in Fettkörper-Proteine in vitro

| Präparationen | dpm/Fettkörper-Präparation | s |
|---|---|---|
| Wirkung der Sauerstoffversorgung | | |
| Mit offenen Tracheen Sauerstoffatmosphäre | 166.804 | 30.385 |
| Luft | 179.532 | 23.536 |
| Ohne offene Tracheen Sauerstoffatmosphäre | 22.890 | 7.541 |
| Luft | 14.057 | 1.963 |
| Wirkung von PTU | | |
| Fettkörper in PTU-haltigem Medium gewaschen | 169.293 | 23.770 |
| Fettkörper in PTU-haltigem Medium inkubiert | 39.824 | 11.591 |
| Kontrolle | | |
| Mit offenen Tracheen und 1 mM Cycloheximid als Zusatz zum Medium | 9.130 | 405 |

[1] Fettkörper-Präparationen von Bienenarbeiterinnen mit intaktem Tracheensystem bzw. ohne wurden 2 h lang in Tracer-haltigem Medium inkubiert, nachdem sie 3 h vorinkubiert worden waren.

[2] Fettkörper-Präparationen mit offenen Tracheen wurden entweder in Medium inkubiert, das 0.1 mM PTU (Phenylthioharnstoff) enthielt, oder mit PTU-haltigem Medium 3 x vor der Inkubation gewaschen. Sie wurden ebenso lang wie die o.g. Fettkörper-Präparationen inkubiert.

Ergänzend wurden die Inkorporationsraten der ventralen und dorsalen Abdominalhälften miteinander verglichen (Tab. 24). Sie waren bei der ventralen Hälfte um mehr als eine Zehnerpotenz niedriger als bei den dorsalen. Bei der Präparation der ventralen Hälften konnten die Traccheen nicht vollständig erhalten werden, weil sie sehr fein waren und in der Regel bei der Präparation abrissen. Auf dem Hintergrund der o.a. Untersuchungen zur Bedeutung des Tracheensystems überraschte denn auch die niedrige Protein-Synthese der ventralen Hälften nicht. Die ventralen Hälften wurden daher bei in vitro-Untersuchungen nicht mehr verwendet.

Tab. 24 Vergleich der $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Proteine von ventralen und dorsalen Abdominalkarkassen in vitro*

| Präparation: Abdominalkarkasse | n | Tracer-Inkorporation dpm | s |
|---|---|---|---|
| ventral | 3 | 14 889 | 3 839 |
| dorsal | 3 | 150 734 | 41 010 |
| Kontrolle | 2 | 5 304 | 236 |

* Arbeiterinnen-Abdomen wurden in ventrale und dorsale Hälften geteilt, 3 h lang vorinkubiert und 2 h inkubiert.

Es stellte sich bei längeren Inkubationen heraus, daß es notwendig war, die Polyphenoloxidase zu hemmen, die eine Melanisierung des Inkubationsmediums verursachte. Der PTU, der häufig zur Hemmung des Enzyms eingesetzt wird (MAZZONE, 1976), war jedoch toxisch, wenn er in einer Konzentration von 2,5 mg/100 ml zum Medium zugesetzt wurde. Wenn die Organe vor ihrer Inkbation mit PTU-haltigem Medium nach der Methode, die RIDDIFORD et al. (1979) beschrieben hatten, gewaschen wurden, konnte die Melansierung des Mediums verhindert werden, ohne daß die Proteinsynthese beeinflußt wurde (Tab. 23). Im Medium gelöste PTU-Konzentrationen von 0,25 mg und 0,5 mg/100 ml Medium waren zwar nicht toxisch, aber sie konnten die Melanisierung nach 6 h Vorinkubation nicht verhindern. Daher wurden alle nachfolgenden Präparationen vor der Inkubation in PTU-haltigem Medium gewaschen.

Dann wurde untersucht, wie lange die Fettkörper in vitro Proteine synthetisieren (Abb. 26). Dazu wurden sie unterschiedlich lange vorinkubiert. Das Medium wurde alle 12 h gewechselt, und dann wurden die Fettkörper für eine Stunde in Medium mit $^{3}$H-Leucin inkubiert. Dabei wurden während der ersten 10 h nach der Exposition des Fettkörpers sehr große Schwankungen des Inkorporationsniveaus gemessen, die als Wundreaktion des Fettkörpers oder als

"Kulturschock" interpretiert werden könnten. Bei allen längeren Expositionszeiten blieb die Inkorporation während der nächsten 60 h konstant. Das heißt, daß der Fettkörper mindestens für drei Tage in vitro aktiv blieb, und daß die Vorinkubationszeit wegen der aufgetretenen Schwankungen mindestens 12 h betragen mußte.

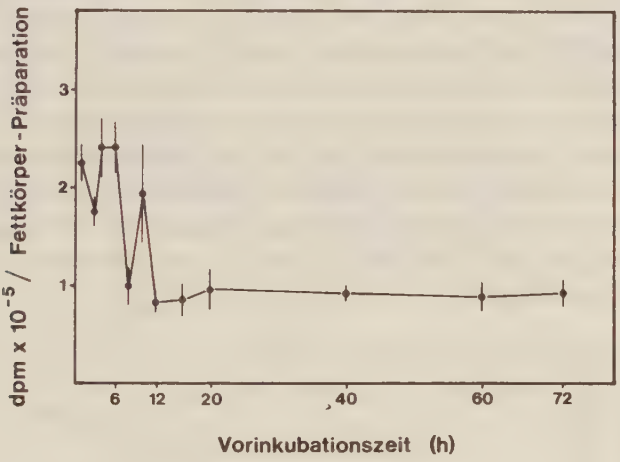



Abb. 26 Einbau von $^{3}$H-Leucin in Proteine von Arbeiterinnen-Fettkörper-Präparationen in Abhängigkeit von ihrer Expositionsdauer in vitro.

Nach verschiedenen Vorinkubationszeiten wurde der Tracer für 1 h hinzugefügt. n = 3

Nebenbei bemerkt: Die Lebensfähigkeit der Präparationen konnte auch außerordentlich gut an der Kontraktion des dorsalen Herzgefäßes kontrolliert werden. Wenn es aufhörte, sich zu kontrahieren, konnte dies als wichtiges Indiz für mangelnde Güte des Mediums oder der Präparation gelten. So blieb es kurze Zeit nach der Exposition im modifizierten Kulturmedium nach BLOMQUIST et al. (1980) stehen. Andererseits kontrahierte es sich in einem Experiment, das in Ithaca durchgeführt wurde, im neu entwickelten Medium mindestens 13 Tage lang. (Das Experiment mußte abgebrochen werden weil das Flugzeug nach Frankfurt deshalb sicherlich nicht gewartet hätte).

Die Kinetik der $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Fettkörper-Präparationen der Arbeiterinnen (Abb. 27) ergab eine konstante Protein-Syntheserate während der ersten 4 Stunden. Deshalb wurde für alle nachfolgenden Experimente mit Arbeiterinnen-Fettkörpern eine zweistündige Inkubationszeit ausgewählt.

Schließlich wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Leucin-Konzentrationen auf die Inkorporation auswirken (Abb. 28). Maximale Inkorporation wurde bei 1 mM Leucin erzielt. Bei höheren Leucin-Konzentrationen konnte die Inkorporation nicht mehr gesteigert werden. Gleichzeitig waren die meßbaren Zerfälle bei diesen hohen Leucin-Konzentrationen sehr niedrig. Bei niedrigen Leucin-Konzentrationen blieb die eingebaute Aktivität im Bereich von 0,2 µM bis 20 µM konstant bei 280 000 dpm/Fettkörper-Präparation, dann nahm sie rasch ab. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurden Leucin-Konzentrationen von 0,2 µM verwendet. In Zukunft sollten jedoch mindestens 20 µM Leucin eingesetzt werden, um die Synthesekapazität des Fettkörpers auszunutzen.

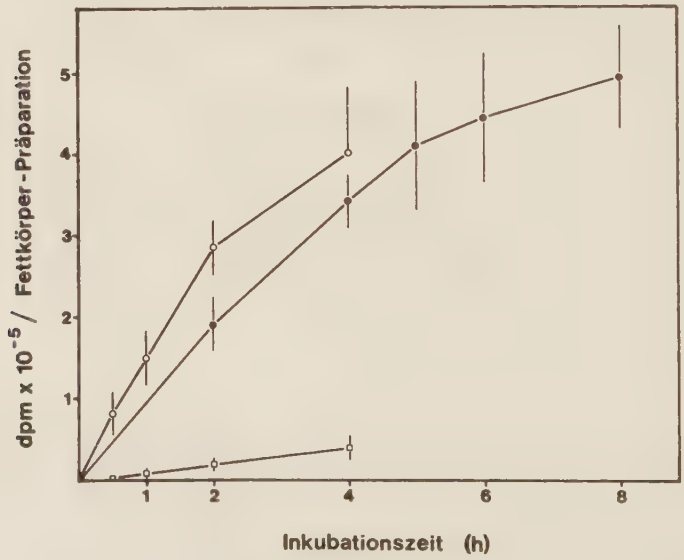



Abb. 27 Kinetik der $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Proteine von Arbeiterinnen- und Königinnen-Fettkörper-Präparationen in vitro.

Fettkörper-Präparationen mit intaktem Tracheensystem wurden 12 h vorinkubiert und verschieden lange inkubiert. Arbeiterinnen-Fettkörper-Präparationen (●), Königinnen-Fettkörper-Präparationen ohne Medium (○) und die Medien der Königinnen-Fettkörper-Präparationen (▫) wurden auf ihren Tracer-Einbau untersucht. n = 3

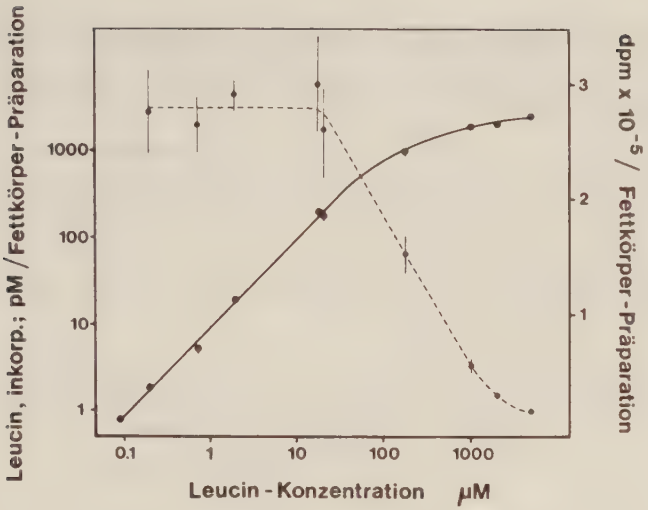



Abb. 28 Wirkung der Leucin-Konzentration auf den Einbau in Fettkörperproteine in vitro.

Nach 12 h Vorinkubation wurden Arbeiterinnen-Fettkörper-Präparationen für 2 h in Medium inkubiert, das neben 0.2 µM $^{3}$H-Leucin noch unmarkiertes Leucin enthielt, um die o.g. Leucin-Konzentrationen im Medium zu erreichen. Die durchgezogene Linie repräsentiert die pro Fettkörper-Präparation inkorporierten pM, die gestrichelte Linie die dpm/Fettkörper-Präparation. n = 3 - 6

8.1.2. Adaptation des in vitro-Kultursystems für Fettkörper von Königinnen

Von Königinnen wurde jeweils nur eine Fettkörper-Präparation pro Inkubationsgefäß in vitro kultiviert. Da man davon ausgehen konnte, daß sich der Stoffwechsel der Königinnen und die Menge inkubierten Gewebes von dem de der Arbeiterin unterscheidet, wurde die Kinetik der Leucin-Inkorporation bei eierlegenden Königinnen gesondert bestimmt - alle anderen Ergebnisse der Untersuchungen zu den Kulturbedingungen wurden von den Arbeiterinnenversuchen übernommen.

Nach zwölfstündiger Vorinkubation war die Tracerinkorporation für 2 Stunden konstant (Abb. 27). Die Leucin-Inkorporationsrate bei Königinnen war um das 3,2-fache höher als bei Arbeiterinnen. Außerdem wurde die Aktivität markierter Mediumproteine bestimmt. Nach einer lag-Phase, die höchstens 30 min dauerte, stieg die Inkorporation in präzipitierbare Proteine des

Mediums für die nächsten 210 min linear an. Königinnen-Fettkörper-Präparationen durften daher in allen nachfolgenden Experimenten nur maximal 2 h lang inkubiert werden.

Wie bei den Arbeiterinnen wurden außerdem die Einbauraten der ventralen und dorsalen Abdominalkarkassenhälften verglichen. Den ventralen Präparationen fehlte ein vollständiges Tracheen-System. Die von ihnen inkorporierte Aktivität betrug vermutlich deshalb nur 1/7 der Proteinmarkierung der dorsalen Hälften (Tab. 25), weshalb sie später nicht mehr für die in vitro-Kultur verwendet wurden.

Tab. 25 Vergleich der Tracer-Inkorporation in Proteine der ventralen und dorsalen Abdominalkarkassenhälften von Königinnen in vitro *

| Präparation | n | Tracer-Inkorporation dpm | s |
|---|---|---|---|
| ventral | 3 | 49 519 | 24 738 |
| dorsal | 3 | 246 112 | 48 179 |
| Kontrolle | 2 | 16 759 | 494 |

* 12 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 25 µCi/ml

8.1.3. Ovarkulturbedingungen

Auch die entnommenen Ovarien wurden in vitro inkubiert und ihre Leucin-Inkorporation bestimmt. Ovarien eierlegender Königinnen wurden verwendet, um die Kulturbedingungen für Ovarien zu ermitteln. Es konnte erneut nachgewiesen werden, daß ein offenes Traccheensystem essentiell war, da die Proteinsynthese in vitro bei Ovarien mit zur Umgebungsluft offenem Tracheensystem 15,1 mal höher war als ohne (Tab. 26).

Die Inkorporation in Ovarproteine war 2 h lang konstant (Abb. 29). Für alle nachfolgenden Experimente wurde daher eine 90 minütige Inkubationsdauer ausgewählt. Die Ovarien lebten für mindestens 20 h in Kultur (Abb. 30). Längere Inkubationszeiten wurden nicht ausprobiert. Überraschenderweise konnte keine Wundreaktion der Art nachgewiesen werden, wie sie bei den Fettkörper-Präparationen beobachtet worden war. Mit diesen Experimenten waren die Rahmenbedingungen für die in vitro-Kultur von Ovarien abgeklärt.

Tab. 26 Wirkung des intakten Tracheensystems auf die Tracer-Inkorporation in lösliche Ovarproteine in vitro[1]

| Präparationen | dpm/Ovar-Präparation | s |
|---|---|---|
| Ovarien mit offenen Tracheen | 575.392 | 38.901 |
| Ovarien ohne offene Tracheen | 47.409 | 5.611 |
| Kontrollen[2] | 9.917 | 205 |

[1] Die Ovarien wurden 6 h lang in Medium ohne $^{3}$H-Leucin vorinkubiert und dann 2 h lang in Medium mit Tracer inkubiert.

[2] Die Kontrollen wurden mit 1 mM Cycloheximid-haltigem Medium vorinkubiert und inkubiert.

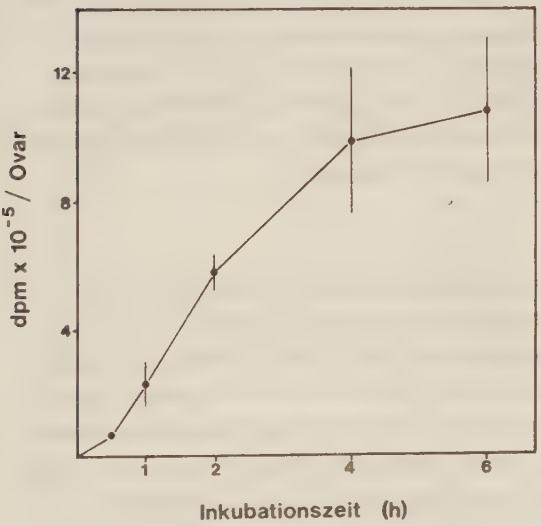



Abb. 29

Kinetik der $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Ovarproteine eierlegender Königinnen in vitro.

Die Ovarien wurden 12 h vorinkubiert und dann verschieden lang in Tracer-haltigem Medium inkubiert. n = 3

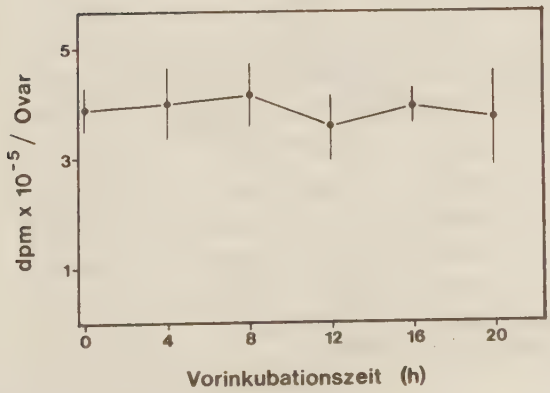



Abb. 30

Einbau von $^{3}$H-Leucin in Proteine von Königinnen-Ovarien in Abhängigkeit von ihrer Expositionsdauer in vitro.

Nach verschiedenen Vorinkubationszeiten wurde der Tracer für 90 min hinzugefügt. n = 3

## 8.2. Experimente zur Optimierung des in vitro-Kulturmediums

Nachdem es gelungen war, die Kulturbedingen für Fettkörper und Ovarien der Honigbiene auf der Basis der Proteinsynthese-Untersuchungen zu optimieren, sollte in ergänzenden Experimenten an Arbeiterinnen geprüft werden, ob die gewählten Rahmenbedingungen von pH und Osmolarität in der Tat das Optimum für die Proteinsynthese der Fettkörper darstellen, oder ob die Proteinsynthese durch eine Veränderung der Medienzusammensetzung noch erhöht werden könnte.

Im letzten der Experimente, die die Frage der optimalen Leucin-Konzentration behandelten (vgl III.8.1.1.), war die Einbaurate bei einer Kontrollgruppe, die vor der eigentlichen Inkubation mit $^{3}$H-Leucin zweimal 1 min lang mit Leucin-freiem Medium gewaschen und inkubiert wurde, um fast das Doppelte höher. Offenbar wurde durch diese Prozedur der gewebeinterne Leucin-Pool erniedrigt, Spuren des Leucin-haltigen Vorinkubationsmediums entfernt, und somit die Tracer-Inkorporation gesteigert. Aus diesem Grunde wurde in allen Experimenten zur Medienoptimierung jede Präparation zweimal 1 min lang mit Leucin-freiem Medium vorinkubiert.

### 8.2.1. pH-Wert

Zuerst wurde die Wirkung der Wasserstoffionen-Konzentrationen auf die Proteinsyntheseaktivität von Fettkörper-Präparationen mit Medien (s. II. 3.9.) geprüft, die sich im wesentlichen nur im pH-Wert unterschieden. Die Inkorporationsrate war bei pH 6,7, dem pH der Hämolymphe adulter Bienen, am höchsten (Tab. 27). Sie sank sowohl bei höheren wie niedrigeren Wasserstoffionen-Konzentrationen und lag bei pH 6,0 um etwa 10 %, bei pH 7,0 gar um 26 % niedriger. Allerdings unterscheiden sich nur die Syntheseraten bei pH 5,5 und 7,5, die 22 % bzw. 38 % niedriger lagen, im U-Test ($p = 0,05$) statistisch signifikant von denen bei pH 6,7.

Tab. 27 Einfluß des pH auf die $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Proteine in vitro inkubierter Arbeiterinnen-Fettkörper*

| | Tracer-Inkorporation | | | |
|---|---|---|---|---|
| pH | n | dpm | s | % Maximum |
| 5,5 | 4 | 237 757 | 13 576 | 78,2 |
| 6,0 | 4 | 272 321 | 63 698 | 89,6 |
| 6,7 | 8 | 303 891 | 51 199 | 100,0 |
| 7,0 | 4 | 224 906 | 74 211 | 74,0 |
| 7,5 | 4 | 187 635 | 47 278 | 61,7 |

* 7 d alte Arbeiterinnen, 12 h Vorinkubation
2 h Inkubation, 15 µCi/ml Medium

8.2.2. Osmolarität des in vitro-Kultur-Mediums

Die Wirkung der Osmolarität auf die Tracer-Inkorporation wurde geprüft, indem die Medien mit Saccharose auf die gewünschten Osmolaritäten eingestellt wurden. Es stellte sich heraus, daß bei Osmolaritäten von 450 mOsm/l bis 550 mOsm/l gleich viel Tracer inkorporiert wurde (Tab. 28). Erst bei 600 mOsm/l, d.h. 70 mOsm/l mehr als in der Hämolymphe gemessen wurde, sank die Syntheseaktivität des Fettkörpers um 18 % - bei 750 mOsm/l sogar um 40 %. Der Mittelwert des bei 750 mOsm/l bestimmten Tracer-Einbaus unterscheidet sich im t-Test ($p = 0,05$) signifikant von denen bei 450 mOsm/l bis 550 mOsm/l. Darüberhinaus konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, auch wenn die Einbaurate bei 600 mOsm/l erniedrigt war. Diese Ergebnisse wurden bei zwei Wiederholungen bestätigt.

Tab. 28 Einfluß der Osmolarität des Mediums auf die Inkorporation von $^{3}$H-Leucin in Fettkörper-Proteine von Arbeiterinnen in vitro*

| mOsm/l | n | Tracer-Inkorporation dpm | s |
|---|---|---|---|
| 450 | 4 | 566 537 | 112 297 |
| 500 | 4 | 553 085 | 109 375 |
| 550 | 4 | 582 659 | 152 130 |
| 600 | 4 | 479 569 | 117 023 |
| 750 | 4 | 353 313 | 142 563 |

* 7 d alte Arbeiterinnen, 12 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 25 µCi/ ml Medium

8.2.3. Vitamine und Phosphatgehalt

Bei der Medienherstellung trat das Problem auf, daß der Gehalt an anorganischem Phosphat der Honigbienen-Hämolymphe (HOSKINS und HARRISON, 1934) höher ist als im Medium. Als ursprünglich Medien mit höherem Phosphat-Gehalt hergestellt wurden, fiel Kalziumphosphat wegen seines niedrigen Löslichkeitsprodukts aus, wenn das Medium kühl gelagert wurde. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß niedrigerer Phosphat-Konzentrationen auf die Proteinsynthese des Fettkörpers untersucht. Außerdem wurde der Einfluß von Vitaminen geprüft.

Die Inkorporation in Fettkörper-Proteine 3 Tage alter Arbeiterinnen war sowohl bei den Medien mit und ohne Vitamine, sowie mit 8 mM oder 5 mM anorganischem Phosphat gleich (Tab. 29). Die gemessenen Unterschiede sind

statistisch nicht signifikant (t-Test, p = 0,05). Vitamine sind offenbar für die 16 h lang und damit kurzzeitig im Medium exponierten Gewebe nicht essentiell. Auch die gesenkte Phosphat-Konzentration hatte keinen negativen Einfluß.

Tab. 29 Einfluß wasserlöslicher Vitamine und anorganischen Phosphats auf die $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Proteine von Arbeiterinnen-Fettkörpern in vitro*

| Medien-Zusatz | n | Tracer-Inkorporation dpm | s |
|---|---|---|---|
| 8mM Phosphat | 4 | 265 786 | 50 925 |
| 5mM Phosphat | 4 | 248 122 | 32 607 |
| Vitamine * | 4 | 255 009 | 68 857 |

* 3 d alte Arbeiterinnen, 12 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 15 µCi/ ml Medium. Die Vitamine Niacin, Pantothensäure, Pyridoxin, Riboflavin, Cyanocobalamin und Thiamin wurden dem Medium in den von GRACE (1962) angegebenen Konzentrationen sterilfiltriert hinzugefügt.

### 8.2.4. BSA und Ficoll

In jüngerer Zeit wird in der Gewebekultur angestrebt, möglichst definierte Medien zu verwenden, damit untersucht werden kann, wie sich bestimmte Substanzen auf Funktion und Wachstum der Gewebe auswirken. Das im neuentwickelten Medium verwendete BSA ist in diesem Sinn kein definiertes Substrat, weil es bisher nicht vollständig gereinigt werden kann, zumal es im Blut der Vertebraten wichtige Transportfunktionen ausübt. Um dem Ziel eines definierten Mediums näher zu kommen, lag es nahe, seine Bedeutung zu prüfen und außerdem eine in Gewebekulturen verwendete definierte, hochmolekulare Ersatzkomponente, das Ficoll, zu untersuchen.

Es ergab sich, daß Fettkörper-Präparationen in Medien ohne BSA im U-Test signifikant mehr Tracer inkorporieren als in Medien mit BSA (Tab. 30). Der Einbau stieg um etwa 30 %. Die Tracer-Inkorporation wurde durch Ficoll weder gehemmt noch gefördert. Folglich wurden in später durchgeführten Experimenten Medien ohne BSA verwendet.

Tab. 30 Einfluß von BSA und Ficoll auf die $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Proteine von Arbeiterinnen-Fettkörpern in vitro*

| Medien-Zusatz | n | dpm | s |
|---|---|---|---|
| $BSA^{+}$ | 4 | 500 422 | 87 008 |
| $BSA^{-}$ | 3 | 657 266 | 120 103 |
| $Ficoll^{+}/BSA^{-}$ | 4 | 665 082 | 32 532 |

* 6 d alte Arbeiterinnen, 12 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 25 µCi/ml Medium.

### 8.2.5. Puffersubstanzen

Das neben dem Bicarbonat im Medium als Puffer enthaltene PIPES wurde im Vergleich zum HEPES in Gewebekulturen nur selten verwandt. Deshalb schien es angebracht, beide Puffersubstanzen in ihrer Wirkung auf die Leucin-Inkorporation zu vergleichen (Tab. 31). Sowohl bei den Homogenaten der Fettkörper-Präparationen wie auch bei den gesondert aufgearbeiteten Medien war die Inkorporationsrate in der Versuchsgruppe mit HEPES-haltigen Medien gegenüber der Vergleichsgruppe erniedrigt. Der Unterschied der Mittelwerte ist bei den Medien, d.h. bei den vom Fettkörper sezernierten Proteinen im t-Test ($p = 0{,}05$) statistisch signifikant, bei den Homogenaten hingegen nicht. Das heißt, das PIPES als Puffersubstanz zumindest nicht schlechter als HEPES ist und im Medium nicht ersetzt zu werden braucht.

Tab. 31 Einfluß der Puffersubstanzen PIPES und HEPES auf die $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Proteine des Fettkörpers in vitro*

| Puffersubstanz | n | Tracer-Inkorporation dpm | s |
|---|---|---|---|
| Fettkörper-Homogenat | | | |
| PIPES | 4 | 692 899 | 123 463 |
| HEPES | 4 | 555 173 | 106 546 |
| Medium | | | |
| PIPES | 4 | 145 368 | 27 697 |
| HEPES | 4 | 75 549 | 62 259 |

* 7 d alte Arbeiterinnen, 20 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 25 µCi/ml Medium. Medium und Homogenat wurden getrennt aufgearbeitet.

## 9. Proteinsynthese von Fettkörper und Ovar in vitro

### 9.1. Fettkörper

Als Fettkörper-Präparationen verschiedener imaginaler Entwicklungsstadien von Königinnen im nunmehr optimierten in vitro-System bezüglich ihrer Protein- und Vitellogenin-Synthese untersucht wurden, stellte sich heraus (Tab. 32), daß sich die Gesamtinkorporationen des Tracers in Fettkörper-Homogenate und die zugleich mit aufgearbeiteten Medien der verschiedenen Stadien quantitativ im U-Test ($p = 0,05$) nicht signifikant unterschieden. Zwar ergaben sich die höchsten Inkorporationsraten bei eierlegenden Königinnen und die niedrigsten bei gerade geschlüpften Imagines, doch sie lag bei ersteren nur um das 1,36-fache höher als bei den letztgenannten. Königinnen, die 3 - 4 bzw. 6 Tage alt waren, inkorporierten den Tracer in Quantitäten, die zwischen den Extremen lagen.

Die Vitellogenin-Synthese hingegen, die bei den gleichen Proben parallel mitgemessen wurde, offenbarte deutlich signifikante Unterschiede zwischen eierlegenden Königinnen auf der einen Seite und jenen Königinnen, die noch vor dem Hochzeitsflug standen (U-Test, $p = 0,05$). Die Inkorporation in mit dem VG-spezifischen Antiserum präzipitierbare Proteine war bei eierlegenden Königinnen um das 6,1-fache höher als bei gerade geschlüpften, und um das 3,6 bzw. 3,3-fache bei 3 - 4 bzw. 6 Tage alten unbegatteten Königinnen. Der gemessene Anstieg der Vitellogenin-Synthese während der ersten Imaginaltage ist statistisch signifikant (U-Test, $p = 0,05$). Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtinkorporation der in vitro-Präparation betrug zwischen 3,7 % bei früh imaginalen und 16,5 % bei eierlegenden Königinnen.

Tab. 32 Protein- und Vitellogenin-Synthese der Fettkörper-Präparationen von Königinnen verschiedener Entwicklungsstadien in vitro**

| Stadium | n | Tracer-Inkorporation in alle Proteine dpm * | s | Vitellogenin dpm | s | %VG |
|---|---|---|---|---|---|---|
| gerade gehäutet | 3 | 188 731 | 14 317 | 6 926 | 3 008 | 3,7 |
| 3 - 4 d | 3 | 220 289 | 118 723 | 11 763 | 3 480 | 5,3 |
| 6 d | 2 | 208 155 | 129 484 | 12 958 | 6 317 | 6,2 |
| eierlegend | 6 | 257 254 | 84 350 | 42 524 | 14 689 | 16,5 |
| Kontrolle* | 4 | 14 976 | 699 | 0 | | 0,0 |

* Die dpm der Cycloheximid-Kontrolle sind von den dpm der Fettkörper-Homogenate subtrahiert worden.

** 12 h Vorinkubation, 90 min Inkubation, 15 µCi/ml Medium

Protein- und Vitellogenin-Synthese des Fettkörpers waren in vitro nicht nur vom Entwicklungszustand, sondern auch von der Eiablageaktivität der Königinnen abhängig (Tab. 33). Während sich die Gesamtinkorporation in mehreren Experimenten zwischen eierlegenden Königinnen und solchen, die vorübergehend aus der Eiablage gegangen waren, erneut nicht unterschied (U-Test, p = 0,05), war die Vitellogenn-Synthese bei ersteren um das 2,0-fache statistisch signifikant höher (U-Test, p = 0,05) als bei letzteren. Der relative Anteil der Inkorporation in Vitellogenin betrug 12,7 % bzw. 5,5 %. D.h., daß die Vitellogenin-Synthese bei temporär nicht eierlegenden Königinnen auf Werte sank, die in etwa denen von Königinnen vor dem Hochzeitsflug entsprach. Allerdings handelte es sich - um es noch einmal zu betonen - bei allen Versuchstieren um Königinnen, die in kleinen Versuchsvölkern (KBK) gehalten wurden.

Tab. 33 Protein- und Vitellogenin-Synthese von Fettkörpern eierlegender und nicht eierlegender Königinnen in vitro*

| Versuchsgruppe | n | Tracer-Inkorporation in alle Proteine dpm | s | Vitellogenin dpm | s | %VG |
|---|---|---|---|---|---|---|
| eierlegend | 3 | 192 730 | 41 653 | 24 513 | 9 603 | 12,7 |
| nicht eierlegend | 3 | 220 585 | 31 322 | 12 141 | 2 525 | 5,5 |

* 12 h Vorinkubation, 90 min Inkubation, 15 µCi/ml Medium

Durch die gemeinsame Aufarbeitung von Fettkörper und Medium konnte in diesen Experimenten die Synthese von Strukturproteinen und sekretorischen Proteinen nicht getrennt aufgeschlüsselt werden. Deshalb wurde das Medium in den meisten folgenden Experimenten getrennt analysiert. Die Ergebnisse eines entsprechenden Experiments sind in Tabelle 34 wiedergegeben und spiegeln die o.a. Verhältnisse wider: Die Gesamtinkorporationen in die Fettkörper-Homogenate allein unterschieden sich quantitativ nicht voneinander. Die Vitellogenin-Synthese war, ausschließlich im Medium analysiert, bei eierlegenden Königinnen um fast das Doppelte (Faktor 1,90) signifikant höher als bei nicht eierlegenden. Darüberhinaus konnten noch mehr Informationen gewonnen werden: Die Radioaktivität der Proteine des Fettkörper-Homogenates war nicht direkt korreliert mit der der sezernierten Medienproteine, d.h. vom Gesamtumsatz an Tracer kann nicht auf die sekretorische Aktivität geschlossen werden.

Der Anteil der Radioaktivität des Vitellogenins an den im Medium vorkommenden neusynthetisierten Proteinen betrug 57,2 % bei eierlegenden und 57,4 % bei nicht eierlegenden Königinnen. Das bedeutete, daß die Gesamtsyntheseleistung des Fettkörpers zurückging, wenn keine Eier mehr gelegt wurden, der relative Anteil der Vitellogenin-Synthese jedoch konstant blieb.

Tab. 34 Protein- und Vitellogeninsynthese im Fettkörper eierlegender und nicht eierlegender Königinnen in vitro*

| Präparation | n | Tracer-Inkorporation in Proteine des Fettkörper-Homogenats dpm | s | Mediums dpm | s | Vitellogenin dpm | s |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| eierlegende Königinnen | 3 | 718 900 | 221 975 | 160 047 | 50 095 | 97 428 | 48 426 |
| nicht eierlegende Königinnen | 3 | 700 050 | 147 464 | 88 310 | 54 316 | 51 143 | 30 502 |

* 12 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 25 µCi/ml Medium, Medium ohne BSA

In den Experimenten, in denen die Zahl der in den letzten 24 h vor der Präparation abgelegten Eier protokolliert worden war, korrelierten diese Zahl und gemessene Vitellogenin-Synthese positiv (r = 0,989). Als Beispiel seien die Einzeldaten des in Tabelle 33 zusammengefaßten Experiments aufgeführt:

| Zahl der während des letzten Tages gelegten Eier | Tracer-Inkorporation in alle Proteine dpm | Vitellogenin dpm |
|---|---|---|
| 194 | 158 478 | 34 488 |
| 104 | 239 097 | 23 720 |
| 64 | 180 615 | 15 332 |

Legende s. Tab. 33

D.h., daß die Vitellogenin-Synthese der Fettkörper-Präparationen nicht nur nur vom Entwicklungszustand der Königinnen, sondern auch von der Zahl abgelegter Eier abhing.

## 9.2. Proteinsynthese der Ovarien in vitro

In vitro inkubierte Ovarien adulter Bienenköniginnen zeigten quantitativ unterschiedliche inkorporierte Aktivitäten in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungszustand (Tab. 35). Die höchste Proteinsynthese wurde bei eierlegenden Königinnen gemessen. Sie war um das 2,9-fache höher als bei 6-tägigen Bienenköniginnen und um das 7,6 fache höher als bei Ovarien frisch gehäuteter Imagines, deren Ovarien noch nicht in Follikel differenziert waren. D.h., daß im Zusammenhang mit der zunehmenden Differenzierung des Ovars im Laufe der Imaginalentwicklung auch dessen Syntheseleistung zunimmt. Dies ließ sich auch schon aus dem deutlichen Anstieg der Tracerinkorporation um das 2,6 fache während der Zeit vor dem Hochzeitsflug, also etwa zwischen Imaginalhäutung und dem 6. Lebenstag, erkennen. Im t-Test ($p = 0{,}05$) unterscheiden sich die gemessenen Inkorporationen von Ovarien eierlegender, 6 d alter und gerade gehäuteter Königinnen voneinander. Die Proteinsynthese der Ovarien 3 - 4 d alter Königinnen unterscheidet sich quantitativ nicht signifikant von der gerade gehäuteter Tiere.

Bei einem Teil der eierlegenden Königinnen wurde außerdem geprüft, ob sich im umgebenden Medium, in dem die Ovarien inkubiert worden waren, auch markierte Proteine befinden. Bei allen Tieren waren durchschnittlich 2,13 % der Gesamtinkorporation in Proteinen des Mediums zu finden.

Tab. 35 Inkorporation von $^3$H-Leucin in Ovarproteine adulter Bienenköniginnen in vitro*

| Stadium | n | Tracer-Inkorporation in alle Ovarproteine dpm | s | präzipitierbare Prot.** dpm | s |
|---|---|---|---|---|---|
| eierlegend | 17 | 740 341 | 176 196 | 19 471 | 8 292 |
| Medium eierleg. | 11 | 15 769 | 4 738 | 0 | 0 |
| 6 d | 4 | 262 138 | 37 988 | 0 | 0 |
| 3-4 d | 5 | 141 664 | 36 324 | 0 | 0 |
| frisch geschlüpft | 3 | 110 499 | 21 387 | 0 | 0 |
| Kontrolle | 3 | 14 847 | 1 059 | 0 | 0 |

* 12 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 15 µCi/ml Medium
** Mit dem Vitellogenin-spezifischen Antiserum präzipitierbar

Die Proteinsynthese der Ovarien in vitro war - außer vom Entwicklungszustand der Königinnen - auch von der Eiablageaktivität der fertilen, begatteten Königinnen abhängig. Sie ist bei den Ovarien eierlegender Königinnen aus KBK-Völkern im t-Test ($p = 0,05$) signifikant größer - nämlich um den Faktor 1,6 - als bei Ovarien von Königinnen, die sich temporär nicht in Eilage befinden (Tab. 36). Außerdem bestand zwischen der Zahl der während des letzten Tages vor der Präparation abgelegten Eier (ohne daß die Zahl eventuell von Arbeiterinnen aufgefressener Eier berücksichtigt werden konnte) und der Ovarsynthese der Königin in vitro eine positive Korrelation mit dem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,615$ ($n = 29$).

Tab. 36 $^3$H-Leucin-Inkorporation in Ovarien eierlegender und temporär nicht eierlegender Königinen in vitro*

| Eilageaktivität | n | Tracer-Inkorporation dpm | s |
|---|---|---|---|
| eierlegend | 11 | 726 533 | 205 932 |
| nicht eierlegend | 10 | 448 025 | 145 301 |
| Kontrolle | 2 | 12 736 | 2 229 |

* 14 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 25 µCi/ml Medium

Ein sehr interessantes Phänomen konnte bei den Experimenten beobachtet werden, bei denen die Ovarien eierlegender Königinnen verschieden lang in vitro exponiert wurden (vgl. auch Abb. 30). Die gemessene Syntheseaktivität der Ovarien einer Königin, die verschieden lang exponiert wurden, entsprachen sich unabhängig von der Expositionsdauer der explantierten Organe im in vitro-System (Tab. 37). Ihr berechneter Maßkorrelationskoeffizient beträgt $r = 0,967$ und ist im t-Test nach FISHER (Zit. aus CLAUSS und EBNER, 1972) mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0,001$ hochsignifikant von der Hypothese $r = 0$, d.h. der Annahme, daß keine Korrelation vorliege, unterschieden. Auch diese Einzelfallanalyse bestätigt, daß die Proteinsynthese der Ovarien während der ersten 20 h der in vitro-Kultur konstant ist (vgl. Abb. 30).

Dieser Befund wurde in einem Experiment ausgenutzt, bei dem die Wirkung von JH III auf die Proteinsyntheserate von Ovarien eierlegender Königinnen geprüft wurde. Von den beiden Ovarien einer Königin wurde eines mit $10^{-3}$M JH III das andere ohne JH III vorinkubiert und inkubiert. Juvenil-

hormon beeinflußt die Proteinsynthese quantitativ weder bei eierlegenden noch bei nichteierlegenden Königinnen (Tab. 38). Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich nur zwischen den Syntheseaktivitäten JH-unbehandelter eierlegender und nicht eierlegender Königinnen. Diese Ergebnisse bestätigten erneut, daß die Proteinsynthese der Ovarien von der Eiablageaktivität abhängig ist.

Tab. 37 $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Fettkörper- und Ovarproteine eierlegender Königinnen in vitro*

| | Aufstellung der Einzeldaten | | |
|---|---|---|---|
| Königin Nr. | Fettkörper | Ovar 1 | Ovar 2 |
| 1 | 33 758 | 80 426 | 64 044 |
| 2 | 29 529 | 90 991 | - |
| 3 | 26 993 | 104 669 | 90 147 |
| 4 | 29 870 | 72 584 | 61 800 |
| 5 | 17 964 | 30 058 | - |
| 6 | 50 924 | 37 515 | 42 535 |
| 7 | 20 781 | 59 007 | - |
| 8 | 30 473 | 79 017 | 74 901 |
| 9 | 47 996 | 68 361 | - |
| 10 | 38 789 | 89 712 | 83 467 |

* Die Daten geben die gemessenen cpm der auf die Filter pipettierten Aliquoten wieder.

Tab. 38 Einfluß von $10^{-3}$M JH III auf die $^{3}$H-Leucin-Inkorporation in Ovarproteine von Königinnen in vitro*

| Ovar-Präparation | n | Tracer-Inkorporation dpm | s |
|---|---|---|---|
| eierlegende Königinnen | | | |
| JH$^-$ | 3 | 753 994 | 268 501 |
| JH$^+$ | 3 | 699 078 | 177 953 |
| nicht eierlegende König. | | | |
| JH$^-$ | 3 | 379 437 | 73 894 |
| JH$^+$ | 3 | 493 753 | 177 917 |

* 12 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 25 µCi/ml Medium

Schließlich wurde geprüft, ob das Ovar Proteine synthetisiert, die mit dem Vitellogenin-spezifischen Antikörper und der indirekten Immunpräzipitation präzipitierbar waren. Überraschenderweise konnten in der Tat in Homogenaten von in vitro inkubierten Ovarien eierlegender Königinnen markierte Proteine mit dem Antikörper präzipitiert werden (Tab. 35). Ihr Anteil an der Gesamtsynthese betrug bei allen 17 untersuchten Königinnen im Durchschnitt 2,63 %. Dagegen konnten aus dem Homogenat der Ovarien aller untersuchter Entwicklungsstadien von Königinnen vor dem Hochzeitsflug keine markierten Proteine mit Protein A präzipitiert werden, obwohl der Fettkörper zu diesem Zeitpunkt schon Vitellogenin synthetisierte. Ebenso konnte im Medium inkubierter Ovarien eierlegender Bienenköniginnen keine spezifische Aktivität im Immunpräzipitat gemessen werden. Das bedeutet, daß nur im Ovar eierlegender Königinnen Proteine produziert werden, die an den Antikörper binden und nicht in das umgebende Medium gelangen.

Zu guter Letzt wurde berechnet, ob die gemessenen Syntheseaktivitäten von Fettkörper und Ovar einer Königin zusammenhängen. Der Korrelationskoeffizient von r = 0,058 (n = 10) - vgl. Tabelle 37 - unterscheidet sich nicht von der Annahme, daß zwischen der Proteinsynthese von Ovar und Fettkörper eines Individuums in vitro quantitativ keine Korrelation besteht.

## 10. Beeinflussung von Protein- und Vitellogeninsynthese des Fettkörpers durch verschiedene Faktoren

Um zu prüfen, ob sich die Syntheseaktivität des Fettkörpers in vitro durch Faktoren wie Hormone, Hämolymphe u.ä. beeinflussen ließ, wurden Fettkörper von Königinnen mit ihnen inkubiert und ihre Protein- und Vitellogenin-Synthese quantifiziert.

### 10.1. Juvenilhormon

Da Juvenilhormon bei vielen Insekten die Vitellogenin-Synthese steuert und auch bei Arbeiterinnen den Vitellogenin-Titer beeinflußt, erschien es zuallererst sinnvoll, den Fettkörper in vitro mit JH zu exponieren. Fettkörper eierlegender und temporär nicht eierlegender Königinnen wurden von $10^{-3}$M JH III, der höchstmöglichen wasserlöslichen Konzentration, weder in

ihrer Protein- noch in ihrer Vitellogenin-Synthese beeinflusst (Tab. 39). Alle vier Vergleichsgruppen wichen quantitativ in ihrer Proteinsynthese statistisch nicht signifikant voneinander ab (U-Test, p = 0,05). Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich lediglich in der Vitellogenin-Synthese zwischen den beiden Gruppen, die sich in Eiablage befanden, und denen, die vorübergehend keine Eier legten. Dort wurde bestätigt, daß die Vitellogeninsynthese bei eierlegenden höher ist als bei nicht eierlegenden Königinnen.

Tab. 39 Einfluß von $10^{-3}$M JH III auf Protein- und Vitellogenin-Synthese des Fettkörpers von Königinnen in vitro*

| Fettkörper-Präparation | n | Tracer-Inkorporation in alle Proteine dpm | s | Vitellogenin dpm | s |
|---|---|---|---|---|---|
| eierlegende Königinnen | | | | | |
| $JH^-$ | 3 | 190 734 | 39 465 | 17 596 | 4 638 |
| $JH^+$ | 3 | 169 547 | 14 972 | 15 653 | 6 206 |
| nicht eierlegende König. | | | | | |
| $JH^-$ | 3 | 208 733 | 57 921 | 5 785 | 1 306 |
| $JH^+$ | 3 | 222 610 | 42 173 | 8 604 | 2 567 |

* 12 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 15 µCi/ml Medium. Nur Analyse der Homogenate.

10.2. Hämolymphe

Nachdem es nicht gelungen war, den Fettkörper in vitro durch Juvenilhormon in seiner Protein- und Vitellogenin-Syntheseaktivität zu beeinflussen, wurde die Hämolymphe der Tiere selbst dem Medium 10 %-ig zugesetzt und ihre Wirksamkeit auf Protein- und Vitellogenin-Synthese untersucht.

Insgesamt wurden 5 verschiedene Gruppen miteinander verglichen: 4 Gruppen eierlegender Königinnen, die entweder ohne Hämolymphe als unbehandelte Kontrollen, mit 1 min lang hitzeinaktivierter Hämolymphe eierlegender Königinnen, mit 10 min lang hitzeinaktivierter Hämolymphe eierlegender Königinnen, oder mit 10 min lang hitzeinaktivierter Hämolymphe nicht eierlegender Königinnen vorinkubiert und inkubiert wurden. Eine weitere Gruppe von Königinnen, die nicht in Eilage waren, wurde mit 10 min lang hitzeinaktivierter Hämolymphe eierlegender Königinnen behandelt (Tab. 40). Alle 5 Gruppen wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede (U-Test, p = 0,05) in Bezug auf die Inkorporation des Tracers in Proteine des Fett-

körpers auf. Dagegen lag die inkorporierte Aktivität in Proteine des Mediums bei den Fettkörpern nicht eierlegender Königinnen um mehr als 40 % niedriger als bei der nächsthöheren Gruppe, der unbehandelten eierlegenden Kontrolle. Am höchsten war die gemessene Radioaktivität der Medienproteine bei denjenigen eierlegenden Königinnen, die mit 1 min lang hitzeinaktivierter Hämolymphe inkubiert worden waren. Etwas niedriger war die Synthese der Medienproteine bei eierlegenden Königinnen, die mit 10 min lang hitzeinaktivierter Hämolymphe inkubiert worden waren. Noch niedriger und in etwa vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle war die Syntheseleistung der Fettkörper eierlegender Königinnen, die mit Hämolymphe nicht eierlegender Königinnen inkubiert worden waren. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nur zwischen der Gruppe nicht eierlegender Königinnen und den beiden Gruppen, die mit Hämolymphe eierlegender Königinnen inkubiert worden waren (U-Test, $p = 0,05$).

Die Vitellogenin-Synthese war bei den Fettkörpern eierlegender Königinnen, die mit 1 min lang hitzeinaktivierter Hämolymphe inkubiert worden waren, signifikant höher - und zwar um mindestens das 2,1-fache - als bei allen anderen Gruppen (U-Test, $p = 0,05$). Letztere unterschieden sich in ihrer Vitellogenin-Synthese statistisch nicht signifikant voneinander, auch wenn die nicht eierlegenden Königinnen deutlich am wenigsten markiertes Vitellogenin im Medium besaßen. Wenn man die Mittelwerte der Protein- und Vitellogenin-Synthese im Medium betrachtete, konnte man annehmen, daß die gemessene erhöhte Gesamtradioaktivität der Proteine durch die Steigerung der Vitellogenin-Synthese hervorgerufen wird. Diese Vermutung kann aber nach der Analyse der Einzeldaten für jedes Individuum nicht aufrecht erhalten bleiben.

D.h., daß die Hämolymphe eierlegender Königinnen einen stimulierenden Einfluß auf die Synthese sekretorischer Proteine, insbesondere des Vitellogenins, hatte. Zudem war der Einfluß davon abhängig, wie lange die Hämolymphe hitzeinaktiviert wurde. Zehnminütige Hitzebehandlung unterband meßbare Effekte.

Damit lag der Schluß nahe, daß entweder Faktoren der Hämolymphe oder die Hämolymphe als Ganzes sich positiv auswirken. Einige der denkbaren und bei Insekten realisierten Möglichkeiten wurden daher geprüft, nachdem Juvenilhormon als Einflußfaktor schon zuvor ausgeschlossen worden war.

Tab. 40 Einfluß von Hämolymphe auf Protein- und Vitellogenin-Synthese von Königinnen-Fettkörpern in vitro*

| Fettkörper-Präparation | n | Tracer-Inkorporation in Proteine des Fettkörper-Homogenats dpm | s | Mediums dpm | s | Vitellogenin dpm | s | %VG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| eierlegende Königinnen | | | | | | | | |
| ohne Hämolymphe | 6 | 432 587 | 52 309 | 47 317 | 22 342 | 10 079 | 4 426 | 21,30 |
| mit Hämolymphe eierlegender Königinnen, 1 min hitzeinaktiviert | 6 | 385 506 | 49 476 | 74 827 | 36 001 | 30 992 | 10 576 | 39,39 |
| mit Hämolymphe eierlegender Königinnen, 10 min hitzeinaktiviert | 3 | 475 398 | 55 856 | 63 049 | 14 833 | 14 056 | 3 726 | 22,30 |
| mit Hämolymphe nicht eierlegender Königinnen, 10 min hitzeinaktiviert | 3 | 484 548 | 124 089 | 51 995 | 29 501 | 14 662 | 7 954 | 28,19 |
| nicht eierlegende Königinnen | | | | | | | | |
| mit Hämolymphe nicht eierlegender Königinnen, 10 min hitzeinaktiviert | 6 | 463 327 | 45 080 | 27 732 | 11 543 | 7 222 | 6 104 | 26,04 |

* 15 h Vorinkubation, 90 min Inkubation, 25 µCi/ml Medium. 10% Hämolymphe im Medium.

10.3. Kopfextrakte

Fettkörper-Präparationen wurden gemeinsam in Medium vorinkubiert, in dem die Köpfe sieben eierlegender Königinnen extrahiert worden waren (vgl. II. 3.9.7.). Sie wurden anschließend in Medium inkubiert, das Leucin-frei war und in dem ebenso sieben Köpfe eierlegender Königinnen extrahiert worden waren. Als Kontrollen dienten drei unbehandelte Fettkörper-Präparationen eierlegender Königinnen und drei weitere, die im Medium vorinkubiert und inkubiert wurden, das Kopfextrakte von je drei Drohnen-Köpfen enthielt.

Die Inkorporation in Proteine des Fettkörper-Homogenats unterschied sich in allen drei Gruppen nicht (Tab. 41). Entsprechendes traf für die Radioaktivität der im Medium vorkommenden Proteine zu (U-Test, $p = 0,05$). Nur die Vitellogenin-Synthese war bei denjenigen Präparationen, die in Medium inkubiert worden waren, das Königinnen-Kopfextrakte enthielt, um das 2,5-fache erhöht gegenüber den unbehandelten Kontrollen und um das 3,4-fache gegenüber den Drohnen-Kopfextrakt-exponierten Kontrollen. Der prozentuale Anteil der Vitellogenin-Synthese an der im Medium gemessenen Radioaktivität betrug im Mittel 63,4 % - ein Anteil, der unter keinen anderen experimentellen Bedingungen erreicht worden war. Wegen der relativ großen Schwankungen der individuellen Daten unterschied sich die Vitellogenin-Synthese der beiden Kontrollgruppen quantitativ nicht signifikant (U-Test, $p = 0,05$).

10.4. Ovarien

Um den Einfluß der Ovarien auf Synthese und Sekretion des Fettkörpers zu untersuchen, wurden die Fettkörper mit einem Ovar vorinkubiert, dann das Ovar entfernt, und in Leucin-freiem Medium inkubiert, in dem das andere Ovar der gleichen Königin entsprechend lange kultiviert worden war. Als Kontrollen dienten einerseits mit Ovarien vorinkubierte Fettkörper, die dann in Medium mit Tracer ohne weitere Zusätze inkubiert wurden, und andererseits Präparationen, die ohne Ovarien vorinkubiert und inkubiert worden waren.

In die Homogenate des Fettkörpers wurde weitaus weniger inkorporiert, wenn sie zusammen mit den Ovarien vorinkubiert worden waren (Tab. 42). Ihre Radioaktivität betrug nur 38 % bzw. 40 % der unbehandelten und war statistisch signifikant niedriger (U-Test, $p = 0,05$) als die der unbehandelten Kontrollen. Bei den im Medium vorkommenden Proteinen entsprachen sich

Tab. 41 Einfluß von Kopfextrakten auf die Protein- und Vitellogenin-Synthese von Fettkörpern eierlegender Königinnen in vitro*

| Fettkörper-Präparation | n | Tracer-Inkorporation in Proteine des Fettkörper-Homogenats dpm | s | Mediums dpm | s | Vitellogenin dpm | s | %VG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ohne Kopfextrakt | 3 | 543 580 | 150 079 | 120 044 | 49 711 | 25 749 | 17284 | 21,45 |
| mit Kopfextrakt von eierlegenden Königinnen | 3 | 508 319 | 44 097 | 99 747 | 56 205 | 63 194 | 40 478 | 63,36 |
| mit Kopfextrakt von Drohnen | 3 | 554 165 | 172 850 | 103 352 | 31 978 | 18 346 | 10 422 | 17,75 |

* 15 h Vorinkubation, 90 min Inkubation, 25 µCi/ml Medium.

Tab. 42 Einfluß von Ovarien eierlegender Königinnen und 3 x $10^{-8}$M Ecdysteron auf Protein- und Vitellogenin-Synthese der Fettkörper-Präparationen eierlegender Königinnen in vitro*

| Fettkörper-Präparation | n | Tracer-Inkorporation in Proteine des Fettkörper-Homogenats dpm | s | Mediums dpm | s | Vitellogenin dpm | s | %VG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Medium ohne Zusätze | 3 | 900 596 | 350 079 | 120 044 | 49 711 | 26 770 | 12 791 | 22,30 |
| Vorinkubation mit Ovar, Inkubation mit Medium, in dem zuvor Ovarien inkubiert worden waren | 3 | 360 636 | 141 643 | 131 260 | 70 929 | 39 926 | 15 172 | 30,42 |
| Vorinkubation mit Ovar, Inkubation mit Medium ohne Zusätze | 3 | 340 515 | 102 733 | 61 066 | 21 037 | 15 645 | 6 843 | 25,62 |
| Vorinkubation und Inkubation mit 3 x $10^{-8}$M Ecdysteron | 3 | 870 522 | 162 116 | 276 217 | 52 766 | 125 824 | 69 570 | 45,56 |

* 16 h Vorinkubation, 2 h Inkubation, 25 µCi/ml Medium. Medium ohne BSA.

die Tracer-Inkorporationen von unbehandelten Kontrollen und Präparationen, die mit Ovar-exponiertem Medium inkubiert worden waren, während bei den nur mit einem Ovar vorinkubierten Kontrollen die inkorporierte Aktivität um die Hälfte signifikant (U-Test, p = 0,05) reduziert war.

Die Tracerinkorporation in Vitellogenin war zwar zahlenmäßig bei den Präparationen am größten, die mit Ovarien vorinkubiert und Ovar-exponiertem Medium inkubiert worden waren, die gemessenen Unterschiede sind jedoch im U-Test (p = 0,05) nicht signifikant.

### 10.5. Ecdysteron

In der gleichen Experimentserie, in der die Wirkung der Ovarien auf Synthese und Sekretion des Fettkörpers überprüft wurde, wurden auch Präparationen mit Ecdysteron in der bei eierlegenden Königinnen vorhandenen Konzentration von $3 \times 10^{-8}$M vorinkubiert und inkubiert (vgl. III.2.2.).

Die Aktivität der Proteine des Fettkörper-Homogenats war bei unbehandelten Kontrollen und den Ecdysteron-behandelten Proben gleich (Tab. 42). Dagegen war der Tracereinbau bei den Medienproteinen der Ecdysteron-behandelten Fettkörper 2,3 mal und die Vitellogenin-Synthese sogar 4,7 mal höher als bei den unbehandelten Kontrollen. Die signifikanten Unterschiede im U-Test bedeuten, daß Ecdysteron mit 5 %iger Irrtumswahrscheinlichkeit die Synthese sekretorischer Proteine, insbesondere von Vitellogenin, stimuliert.

Ein "dose-response-Experiment", daß diese Ergebnisse vertiefen sollte, indem Fettkörper-Präparationen verschiedenen Ecdysteron-Konzentrationen ausgesetzt wurden, scheiterte, weil in dieser Versuchsreihe die unbehandelten Kontrollen doch erheblich weniger inkorporierten als alle anderen Gruppen des Experiments. Zudem wurden, bedingt durch die späte Jahreszeit, Königinnen verwendet, deren Vitellogenin-Synthese z.T. weniger als 6 % der Synthese aller Medienproteine betrug. Dies hing offenbar damit zusammen, daß sie nur noch wenige Eier legten. Deshalb schwankten die Syntheseraten in den Gruppen beträchtlich, was dazu führte, daß die Standardabweichungen fast so groß wie die Mittelwerte waren. Der einzige signifikante Unterschied in der Vitellogenin-Synthese ergab sich deshalb auch nur zwischen unbehandelten Kontrollen und der Gruppe mit $10^{-9}$M Ecdysteron inkubierten Fettkörper-Präparationen. Das Experiment konnte nicht mehr wiederholt werden, weil keine Königinnen mehr vorhanden waren und die notwendigen Hochzeitsflüge junger unbegatteter Königinnen im Schneetreiben wohl nur von wenig Erfolg gekrönt worden wären.

# IV. DISKUSSION

## 1. Etablierung eines in vitro-Systems zur Kultur von Honigbienen-Organen

### ENTWICKLUNG EINES KULTURMEDIUMS

Seit den Pionierarbeiten von WYATT (1956) und GRACE´(1962) in der in-vitro-Kultur von Insekten sind viele Kulturmedien auf der Basis der Hämolymphzusammensetzung entwickelt worden (WYATT und WYATT, 1976; HINK, 1976; 1980). WYATT entwickelte aus ihren Untersuchungen zur Zusammensetzung der Hämolymphe von Bombyx mori ein synthetisches Medium, das mit 10% Hämolymphe versetzt optimale Bedingungen für die Kultur von Geweben schuf. GRACE gelang es, mit diesem Medium und einigen Modifikationen erst malig Insektenzellinien zu kultivieren. In den wenigen Arbeiten zur in vitro-Kultur von Honigbienen-Embryonen und -Puppen war bisher das Medium von GRACE (1962) eingesetzt worden (STANLEY, 1968; GIAUFFRET et al., 1971; GROBOV et al., 1971). Da die Hämolymphe von Puppen und GRACE's Medium in ihrer Zusammensetzung erheblich von der der Imagines abweichen, wurde auf der Grundlage allgemeiner Grundsätze zur Medienherstellung bei Insekten (VAUGHN, 1971; 1973 ; HINK, 1972), der Zusammensetzung der Hämolymphe adulter Bienen und einem gewissen Anteil an Vermutungen ein neues Gewebekulturmedium zusammengestellt. In ihm inkorporierten explantierte Fettkörper-Präparationen signifikant mehr Tracer als in drei Vergleichsmedien, u.a. doppelt so viel wie im Medium von GRACE (1962).

### BEDEUTUNG DER KOMPONENTEN DES IN VITRO-KULTUR-MEDIUMS FÜR DIE PROTEINSYNTHESE DES FETTKÖRPERS

Der wesentliche Unterschied zwischen den Medien ist - neben dem Aminosäuregehalt - ihre Ionenzusammensetzung (vgl. Tab. 5 und 43), insbesondere das $Na^+$ / $K^+$-Verhältnis. Es beträgt 31,0 in BLOMQUIST's Saline (1980); 45,2 im Aedes-Medium (BOHM et al., 1978); 0,2 in GRACE's Medium (1962) und 1,5 im neuen Medium. Die größten Unterschiede in der Proteinsynthese bestanden zwischen Fettkörpern im neuentwickelten Medium und solchen, die entweder in Aedes-Medium oder im Medium nach BLOMQUIST et al. inkubiert worden waren. Vor allem letzteres unterschied sich nur in der Zusammensetzung seiner Salze vom Honigbienen-Medium. Deshalb liegt die Annahme nahe, daß die physiologische Zusammensetzung der Salze, vor allem das $Na^+/K^+$-Verhältnis, wesentliche Voraussetzung für die sich im Umfang der Protein-

synthese ausdrückende Lebensfähigkeit der explantierten Fettkörper ist. Die Ergebnisse stützen die Annahme von LE DOUARIN (1971), daß das Ionenverhältnis mitentscheidend für die erfolgreiche in vitro-Kultur von Geweben und Zellen sei, und stellen VAUGHN's Aussage (1971) in Frage, Insektenzellen seien in der Lage, ihr internes Ionenmilieu so an die Umgebung anzupassen, daß ihre Funktion nicht beeinträchtigt wird.

Tab. 43 Kationen-Konzentrationen der untersuchten in vitro-Kultur-Medien (mM/l)

| Kation | GRACE's Medium | Aedes-Saline | Saline nach Blomquist et al. |
|---|---|---|---|
| $Na^+$ | 11,51 | 151,4 | 207,5 |
| $K^+$ | 55,0 | 3,35 | 6,7 |
| $Na^+/K^+$ | 0,21 | 45,2 | 31,0 |
| $Mg^{2+}$ | 22,50 | 0,6 | 5,6 |
| $Ca^{2+}$ | 6,76 | 1,9 | 13,5 |
| $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ | 3,33 | 0,316 | 0,415 |
| $\frac{Na^+ + K^+}{Mg^{2+} + Ca^{2+}}$ | 2,273 | 63,1 | 11,2 |

Auch andere einzelne untersuchte Komponenten des Mediums wurden auf ihre Bedeutung für das Niveau der Proteinsynthese des Fettkörpers untersucht: Die Phosphatkonzentrationen von 8 mM und 5 mM im Vergleich führten zur gleichen Syntheserate. Daß sich die Vitamine nicht positiv auswirkten, obwohl sie in fast allen Insekten-Kultur-Medien enthalten sind (VAUGHN und GOODWIN, 1976), mag darin begründet sein, daß die Gewebe während der Inkubation noch aus zellinternen Pools schöpfen konnten. Denn vor allem die wasserlöslichen Vitamine der B-Gruppe sind für Zellinien essentiell (LANDUREAU, 1969) und fördern das Wachstum von Gewebe-Primärkulturen (SANBORN und HASKELL, 1961) und Zellkulturen (HINK, 1972). Die gewählte Puffersubstanz PIPES im Medium bewährte sich gegenüber der häufiger verwendeten HEPES. Das BSA schließlich sollte im Medium entfallen, weil die Proteinsynthese der Fettkörper, die im Medium mit BSA inkubiert wurden, signifikant niedriger war als die der in Medium ohne BSA inkubierten Fettkörper. Es ist dabei unklar, ob Verunreinigungen des Transportproteins die Proteinsynthese hemmen oder ob vom BSA stammendes unmarkiertes Leucin - sei es durch unspezifische Verunreinigung oder seinen Abbau - mit dem Tracer konkurriert. Ficoll als BSA-Ersatzstoff wirkt sich nicht positiv aus.

Die Experimente, in denen der Einfluß von pH und Osmolarität auf die Proteinsynthese untersucht wurde, bestätigen eindrücklich, daß die der Hämolymphe angenäherten Parameter das Optimum für die Proteinsynthese des Fettkörpers darstellen. Die höchsten Inkorporationen wurden bei pH 6,70 gemessen, dem pH der Hämolymphe (HOSKINS und HARRISON, 1934). Ähnliches wurde auch bei Lepidopteren-Zellinien beobachtet (SOHI, 1980). Das Optimum der in der Hämolymphe vorkommenden $\alpha$-Glucosidase liegt bei pH 6,75 (BOUNIAS, 1976) und stützt indirekt den obigen Befund. Der Fettkörper toleriert in vitro mehr als 50 mOsm/l Abweichung von der Osmolarität der Hämolymphe und wird erst bei 600 mOsm/l und vor allem bei 750 mOsm/l in seiner Proteinsyntheseaktivität beeinträchtigt. Diese Beobachtung steht mit einer Reihe von Untersuchungen an Insekten in Einklang (KURTTI und BROOKS, 1972; KURTTI et al., 1974; SOHI, 1980), korrespondiert mit Ergebnissen bei Vertebraten (FISH et al., 1973) und stellt vermutlich ein Charakteristikum tierischer Zellen und Gewebe in vitro dar, das die in-vitro-Bedingungen limitiert.

BEDEUTUNG DES TRACCHEENSYSTEMS FÜR DIE ORGANKULTUR

Neben der Medienzusammensetzung kommt dem offenen und intakten Tracheensystem zentrale Bedeutung für die in vitro-Kultur der Honigbienen-Organe zu: Die Proteinsynthese der Organe mit Tracheen ist bis zum 15fachen (Ovarien eierlegender Könignnen) bzw. 17fachen (Fettkörper von Arbeiterinnen) höher als bei den Präparationen ohne Tracheen. Dieser Faktor in der Organkultur von Insekten ist bisher bis auf eine Notiz von TRUMAN (1978) übersehen worden. Die Erhöhung des $0_2$-Partialdruckes wirkt sich dagegen im Vergleich zum Effekt des Tracheensystems kaum aus. Dies betont die Effektivität des intakten Tracheensystems und die Abhängigkeit der Insektengewebe von dieser Art der Versorgung. Ähnliches wurde kürzlich von inkubierten Fettkörper-Fragmenten von Periplaneta americana berichtet (PHILIPPE, 1982). Sie waren strikt von der Sauerstoffversorgung abhängig: Gewebestücke, die im in vitro-Medium versanken, degenerierten schnell, während andere Stücke, die an der Oberfläche des Mediums schwammen oder mit einem Gitter dort gehalten wurden, ihre Struktur erhielten.

EFFEKT DER LEUCIN-KONZENTRATION AUF DIE PROTEINSYNTHESE

Die freien Aminosäuren des Mediums wurden hinsichtlich ihrer Bedeutung nicht im Einzelnen untersucht, obwohl sie sicher eine zentrale Rolle im physiologischen Gleichgewicht der Hämolymphe spielen. Als einzige Amino-

säure wurde das Leucin näher geprüft, um die optimale Konzentration für die höchsten Inkorporationsraten zu ermitteln. Sie beträgt 1 mM Leucin und ist damit 35 mal höher als bei Locusta-Fettkörpern (WYATT et. al., 1976) und 5 mal so hoch wie bei Fettkörper-Präparationen von Hyalophora cecropia (STEVENSON und WYATT, 1962). Bei höheren Leucin-Konzentrationen wird nicht mehr Leucin eingebaut, weil das inkorporierende System bei 1 mM offenbar mit Vorstufen abgesättigt ist. Diese Konzentration spiegelt zugleich exakt die in der Hämolymphe gemessene Konzentration der freien Aminosäure wider (WANG und MOELLER, 1970).

Allerdings liegt dieser Interpretation der Leucin-Konzentrations-Experiments eine Hypothese zugrunde, die nicht unumstritten ist: Wenn die gemessene inkorporierte Aktivität der Proteine des Fettkörpers (s. Abb. 28) durch Multiplikation mit der im Medium vorliegenden Leucin-Konzentration in inkorporierte Mol Leucin transformiert wird, dann liegt dieser Transformation die Annahme zugrunde, daß die extrazellulären Aminosäuren von den Zellen aufgenommen, schnell aktiviert und sofort an eine t-RNA gebunden werden. Sie passierten dabei den in der Zelle existierenden TCA-löslischen Pool der gleichen Aminosäure (KIPNIS et al., 1961; ROBERTSON und WHEATLEY, 1979). Die lineare Kinetik der Aminosäure-Inkorporation und das Fehlen eine lag-Phase gelten als Indizien für diese Hypothese. Doch es gibt bei Vertebraten auch gegenteilige experimentelle Evidenzen, die zu der Hypothese führten, der intrazelluläre TCA-löslische Pool liefere die Vorstufen, externe markierte Moleküle müßten sich zuerst mit dem Pool equilibrieren, ehe eine lineare Kinetik beobachtet werden könne (KEMP und SUTTON, 1971; ROBINSON, 1977). In neueren Untersuchungen an Säugetierzellkulturen wurde radioaktiv markiertes Leucin sofort linear inkorporiert, nachdem in 5 sec-Intervallen nach Applikation gemessen wurde (WHEATLEY, 1982). Das gilt aber nicht für das Glycin. Der Unterschied wird damit erklärt, daß für bestimmte Aminosäuren ein zellinterner Pool existiere. Eine entsprechende lineare Inkorporation trifft auch für E. coli (BRITTEN und McCLURE, 1962) und Tetrahymena (WHEATLEY und WALKER, 1980) zu. Für Insekten bleibt zu bedenken, daß bei diesem Tierstamm Aminosäuren in hoher Konzentration in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand in der Hämolymphe und teilweise auch intrazellulär vorliegen (FLORKIN und JEUNIAUX, 1974). Es fehlen noch entsprechend detaillierte Studien, die die Annahmen linearer Inkorporation von Leucin ungeachtet des zellinternen Pools stützen und somit die in der Literatur häufig vorgenommene Transformation der inkorporierten Aktivität in inkorporierte Mol/l letztendlich als zulässig erklären.

VERGLEICH DER PROTEINSYNTHESEN IN VIVO UND IN VITRO

Die Qualität des in vitro-Systems kann außer aus den Experimenten, die es aufgrund der Tracer-Inkorporationsraten und ihrer Optimierung charakterisieren, auch aus dem Vergleich von Vorkommen und Synthesemuster der Hämolymphproteine in vivo und in vitro beurteilt werden. So gleichen sich die Markierungsindizes von Königinnen in vivo (Tab. 15) und in vitro (Tab. 32), wenn man sie qualitativ in ihren relativen Verhältnissen zueinander - unter Berücksichtigung der Standardabweichung - betrachtet: Die Inkorporation in Vitellogenin in vivo (in vitro) steigt von frisch gehäuteten zu Jungköniginnen nach dem Schlupf um das 2,1-(1,7-)fache und zu eierlegenden Königinnen um das 7,2-(6,2-)fache. In vivo wie in vitro hängt die Vitellogenin-Synthese außerdem von der Eiablageaktivität der Königin ab (Tab. 16 und Tab. 33 ff.). Weiterhin entspricht das Muster der in das Medium sezernierten Proteine und ihre Synthese weitgehend dem Muster der Hämolymphprote (Abb. 19), was natürlich zugleich bedeutet, daß der Fettkörper Hauptsyntheseort der Hämolymphproteine ist (KINNEAR und THOMSON, 1975; WYATT, 1980). Der Fettkörper verhält sich also gemessen an Muster und Markierung seiner Proteinsyntheseprodukte qualitativ in vivo und in vitro gleich.

NEUE POLYPEPTIDE BEI FETTKÖRPER-PRÄPARATIONEN IN VITRO: "WUNDREAKTION"

Bei einer Reihe von Inkubationen (s.a. Abb. 19) traten im Medium Polypeptide auf, die normalerweise in der Hämolymphe nicht vorkommen. Sie sind zwar nur in geringer Konzentration vorhanden, weisen aber eine hohe Markierung auf. Ihr Molekulargewicht von 71 K und 38 K entspricht in etwa dem durch Injektion in vivo auftretenden Polypeptiden von 68 K und 37 K (TRENCZEK, 1984; ZILLIKENS, 1984). Sie werden wahrscheinlich vom Fettkörper gebildet und können eine Folge der Verwundung oder der Kultivierung in vitro ("Kulturschock"?) sein. Schon 1962 beobachteten STEVENSON und WYATT eine erhöhte Proteinsynthese des Fettkörpers verwundeter Seidenspinnerpuppen. Neue Proteine treten auch bei anderen Insekten auf, wenn man sie mit sterilen Salzlösungen (FAYE et al., 1975) behandelt oder auch nur verwundet (CHERBAS, 1973; WYATT und PAN, 1978; OKADA und NATORI, 1983). Der Fettkörper ist nämlich neben den Hämocyten, insbesondere den Granulocyten und Plasmatocyten, die den B- und T-Zellen der Vertebraten funktionell vergleichbar sind (GUPTA, 1984), Hauptbildungsorgan von Immunproteinen (FAYE und WYATT, 1980; BOMAN und STEINER, 1981). Daß durch die in vitro-Kultur des Fettkörpers das "Immunsystem" aktiviert wird, läßt

sich an der Melanisierung des Mediums ablesen. Sie ist eine Folge der Aktivierung der Phenoloxidase, einem Schlüsselenzym des Abwehrsystems der Insekten, das bei Verwundung aktiviert wird und eine wichtige Funktion bei der Erkennungsreaktionskaskade von "self" und "non-self" (GUPTA, 1984) und der Bildung sog. "sticky proteins" zum Wundverschluß (ROWLEY et al., 1984) ausübt. Die in vitro neugebildeten Proteine könnten in der Tat Teil des Abwehrsystems der Honigbiene sein. Auf diesem Hintergrund wird die hohe variierende Syntheseaktivität des Fettkörpers nach der Exposition in vitro im Gegensatz zum Ovar verständlich, weil dem Ovar offenbar die Kompetenz zur Wundreaktion fehlt.

Daß der Fettkörper in vitro vermutlich eine cytostatische Aktivität für Fremdzellen entfaltet, läßt sich daran ablesen, daß auch nach langen Inkubationen (bis zu 13 Tagen) keine Pilze oder Bakterien in Kultur wuchsen. Wenn aber dem Medium Cycloheximid zugesetzt wurde, so trat in diesen Gefäßen fast immer nach längerer Inkubation ein Pilzmycel auf.

AUSBLICK

Trotz des Auftretens der Wundreaktion ist es gelungen, das erste in vitro-Kulturmedium für Hymenopteren und speziell für Honigbienen zu entwickeln, die Bedeutung seiner Faktoren für die Proteinsynthese teilweise zu ermitteln, Fettkörper und Ovarien der Honigbiene für längere Zeit zu inkubieren und das in vitro-System auf der Basis von Bestimmungen der Protein-Syntheseaktivität zu optimieren. Wenn auch das Verhältnis der in vitro- zur in vivo-Metabolismusrate unbekannt ist, spiegelt die Proteinsynthese-Aktivität des Fettkörpers in vitro die in vivo-Situation qualitativ wider. Damit eröffnen sich Möglichkeiten, die Regulation der Proteinsynthese in in vitro-Experimenten näher zu studieren und in Zukunft auch Differenzierungprozesse des Fettkörpers wie auch den Mechanismus der Vitellogenese in vitro näher zu verfolgen.

2. Identifizierung und Charakterisierung von Vitellogenin

Das Vitellogenin der Honigbiene ist nach den vorliegenden Untersuchungen unter denaturierenden Bedingungen ein Polypeptid von 183 K. Es ist bei Königinnen die Hauptbande der Hämolymphproteine, kommt in der Hämolymphe von Arbeiterinnen (ENGELS und FAHRENHORST, 1974) und sogar bei Drohnen als 3-8% aller Hämolymphproteine (TRENCZEK, 1984) vor. Es wird, wie in vitro-Inkubationen von Fettkörper-Präparationen in dieser Arbeit belegen, vom Fettkörper synthetisiert und in die Hämolymphe sezerniert. Es gibt indirekte Hinweise, daß das Vitellogenin selektiv von den Oocyten aufgenommen wird, da außer dem Vitellogenin nur noch zwei der zahlreichen Hämolymph-Polypeptide zumindest ihrem Molekulargewicht nach (151 K und 129 K) als Bande im Ovar vorkommen. Allerdings steht der definitive Beweis via Vitellogenese-Untersuchungen in vitro mit den entsprechenden Polypeptiden noch aus. Der gegen das Vitellogenin hergestellte Antikörper bindet in Hämolymphe, Medium und Ovar nur die Proteine dieser einen Bande. D.h. Vitellogenin und Vitellin sind immunologisch und unter denaturierenden Bedingungen ihrer elektrophoretischen Mobilität nach gleich. Unter nativen Bedingungen weisen sie bisweilen unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten auf (vgl. auch HAGMEISTER; 1976, PAULINO, 1977). Da Vitellogenin und Vitellin geringfügig unterschiedlich an Lektine binden (PAULINO SIMOES, 1984), könnte das Molekül während der Vitellogenese insbesondere in seinen Kohlenhydraten verändert worden sein. Da Vitellogenin ein Glykophospho-Protein ist (ENGELS, 1972; HAGMEISTER, 1976; TRENCZEK, 1984), könnte eine Modifikation des Kohlenhydratanteils oder Konformationsänderungen für die Differenzen in der elektrophoretischen Mobilität verantwortlich sein. Insgesamt erfüllt das Polypeptid von 183 K alle vier genannten Kriterien für Vitellogenin (vgl. I.1.) und kann daher wohl zurecht als das Vitellogenin der Honigbiene bezeichnet werden.

Der Vitellogenin-spezifische Antikörper bindet nur im Fettkörper-Homogenat noch eine zweite Bande (179 K). Die Radioaktivität dieser Bande verschiebt sich in pulse-chase-Experimenten nach 183 K. Dies kann als erster Hinweis dafür gelten, daß es sich um den präsekretorischen Vitellogenin-Vorläufer handelt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß der Antikörper oligospezifisch ist, weil sich im Gel in diesem Bereich beide Banden überlappen könnten, und daher nicht voneinander unterscheidbar wären.

MOLEKULARGEWICHTSVERGLEICH

Das native Molekulargewicht des Vitellogenins von 350.000 d (vgl. ENGELS, 1974) läßt die Möglichkeit offen, daß es sich bei dem denaturierten Polypeptid um ein Monomer des dimeren nativen Proteins handeln könnte. Dies wird auch von HARNISH und WHITE (1982a) vermutet. In den bisherigen Experimenten kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Polypeptid von 179 K das entsprechende Monomer wäre. Das Molekulargewicht von Vitellogenin stimmt mit den Daten, die HARNISH und WHITE (1982a) mit 190 K für das Vitellin gemessen hatten, größenordnungmäßig überein. Zudem liegt die durchschnittliche Standardabweichung der Molekulargewichtsbestimmung via SDS-PAGE bei 3-6% (LAMBIN, 1978). Ein Molekulargewicht von 250 - 300 K (HAGMEISTER, 1976) ist auf unvollständige Denaturierung der Hämolymphproteine in der SDS-PAGE zurückzuführen. Auch die Annahme von LENSKY und SKOLNIK (1980), das Vitellin bestehe aus 26 Polypeptid-Komponenten, ist in erster Linie in methodischen Fehleinschätzungen begründet.

Die Vitellogenin-Synthese-Daten belegen außerdem, daß es sich bei niedermolekularen Banden, die TRENCZEK (1984) mit der Immunoblot-Technik mit dem in dieser Arbeit produzierten Antikörper erhielt, um unspezifische Bindung des Assays bzw. Abbau- und Zerfallsprodukte des Vitellogenins handelt. Denn diese Banden sind nur selten markiert und ihre Markierung steht zudem in keinem konstanten stöchiometrischen Verhältnis zur Markierung des Vitellogenins.

EVOLUTION DER VITELLOGENINE

Aufgrund des Molekulargewichts ordnen HARNISH und WHITE (1982b) in ihrem Modell der Evolution des Vitellogenin-Gens die Honigbienen in die Gruppe von Insekten, bei denen die eine der beiden hypothetischen Domänen der Vitellogenin-Urgens verloren gegangen ist bzw. nicht mehr exprimiert wird. Drosophila ist das bestuntersuchte Beispiel für die Gruppe der Insekten, bei denen nur die kleine Domäne erhalten ist, während beim Großteil aller Insekten die ursprünglichen zwei Domänen exprimiert werden. So besteht z.B. das primäre Transkriptionsprodukt bei Hyalophora cecropia aus zwei Polypeptiden von 180 K und 47 K (MUNDALL and LAW, 1979; HARNISH et al., 1982).

Diese Theorie wird gestützt durch Hybridisierungsexperimente von VG-cDNA mit genomischer DNA, in denen ein erstaunlicher Grad konservativer Vitellogenin codierender Sequenzen nicht nur unter Insekten, sondern auch zwischen Insekten, Amphibien und Vögeln festgestellt wurde (JAMES et al.,

1983). Die Autoren führen diese Ergebnisse auf konservative Regionen des Gens zurück, die für jene Domänen des Moleküls codieren, die spezielle Funktionen erfüllen - insbesondere als Erkennungsregionen für die Aufnahme in die Oocyten.

Auf der anderen Seite steht eine Vielzahl gegenteiliger Befunde, die für die "progressive", schnelle Evolution des Vitellogenins sprechen. So treten immunologische Kreuzreaktionen nur zwischen Vitellogeninen von Arten gleicher Familien auf - z.B. zwischen Locusta und Schistocerca, Calliphora und Lucilia (HARNISH and WHITE, 1982a). Auch die Vitellogenine der vier rezenten Apis-Arten sind immunologisch teilidentisch (HAGMEISTER, 1976). Außerdem ist die Aufnahme von Vitellogenin in die Oocyte streng artspezifisch (TELFER, 1960; BELL, 1972; KUNKEL und PAN, 1976). Bei Drosophila sind die drei Vitellogenin-Gene von je 1,5 kb kürzlich in ihrer Basensequenz vollständig aufgeklärt worden. Sie sind X-chromosomal lokalisiert und codieren für drei Dotterproteine von 45, 46 und 47 K (vgl. BOWNES, 1982). Zwei Gene, YP 1 und YP 2, liegen nur 0,8 kb auseinander und sind gegensätzlich orientiert, das dritte liegt mehr als 1000 kb entfernt. Schon YP 1 und YP 2, die vermutlich durch Genduplikation entstanden sind, unterscheiden sich zu 37% in ihrer Nukleotid-Sequenz und zu 47% in ihrer Aminosäure-Sequenz. Das dritte Gen zeigt noch weniger Homologien (HOVEMANN et al., 1981; HOVEMANN und GALLER, 1982; HUNG und WENSINK, 1981; 1983). D.h. selbst bei einer Art verhalten sich die Vitellogenin-Gene nicht konservativ - wenn auch wahrscheinlich eine Reihe lipophiler Aminosäuren konstant bleibt (Erkennungsregion für die Aufnahme?). Genomische DNS-Restriktionsfragmente von Apis mellifica hybridisieren mit Drosophila YP I - und Hühner-DNS-Klonen nicht (TRENCZEK, 1984). Auch weisen die Restriktionskarten der beiden Vitellogenin-Gene von Locusta untereinander (WYATT et al., 1984) und Aedes (HAGEDORN, 1984) erhebliche Divergenzen auf. Doch stehen diese Befunde nicht in Widerspruch zur Theorie von HARNISH und WHITE (1982b). Gemessen an der allgemeinen Funktion des Vitellogenins, als Nahrungsquelle für den Embryo zu dienen, erscheint jedoch eine schnelle Evolution des Vitellogenins plausibel. Letztendlich bleiben diese Fragen aber solange offen, bis mehr Vitellogenin-Gene sequenziert sind und der Aufnahme-Mechanismus des Vitellogenins geklärt ist.

Nicht unerwähnt soll das Polypeptid von 151 K bleiben, das im Ovar als unmarkierte Bande vorkommt und wahrscheinlich ebenfalls aus der Hämolymphe

selektiv aufgenommen wird. Obwohl es nicht den überwiegenden Anteil wasserlöslischer Proteine im Ovar stellt, treffen 2 Kriterien der Definition von Vitellogenin (HAGEDORN und KUNKEL, 1979) zu. Eine wichtige Bedeutung für die Oogenese ist nicht auszuschließen, vielleicht handelt es sich um Lipophorin (KRAMER et al., 1980). Zumal diese Bande in verschiedenen SDS-Polyacrylamidgelen nicht scharf erschien, was auf einem erhöhten Lipidanteil beruhen könnte.

## 3. Hormon-Titer in der Ontogenese der Bienenkönigin

Mit Hilfe der definierten 15 Puppenstadien (vgl. III.1.) war es möglich, individuelle Puppen wesentlich genauer zu datieren, als es bisherige Untersuchungen zuließen (ZANDER et al., 1916; BERTHOLF, 1925; OERTEL,1930; v. RHEIN, 1933; JAY, 1962b; CZOPPELT und REMBOLD, 1970; REMBOLD et al., 1980). Unter konstanten Entwicklungsbedingungen konnte das Alter der Puppen bis auf wenige Stunden genau bestimmt und ihr weiterer Entwicklungsverlauf vorhergesagt werden. Erst diese differenziertere Stadieneinteilung machte detaillierte Studien über hormonelle Veränderungen während der Metamorphose möglich.

### 3.1. Ecdysteroide

ECDYSTEROID-TITER BEI PUPPEN

Kurz nach der Puppenhäutung der Königin erscheint in der Hämolymphe ein Ecdysteroid-Peak. Er induziert wahrscheinlich u.a. die Apolysis der pupalen und die Bildung der imaginalen Kutikula. Dieser frühe pupale Ecdysteroid-Peak erreicht eine Konzentration von 1,4 x $10^{-6}$M, die dem Erwartungswert entspricht, denn in Gewebe-Kultur sind für die vollständige Kutikulabildung Titer von $10^{-6}$ bis $10^{-7}$ 20-OH-Ecdyson während einer definierten kritischen Zeitspanne vonnöten (vgl. RIDDIFORD, 1980). Er korrespondiert mit histologischen Untersuchungen zur Apolysis bei Arbeiterinnen von Apis mellifica capensis (THOMPSON, 1978), die schon sehr früh in der Puppenphase, bei weißäugigen Puppen, erfolgt. Wenn Apolysis und Ecdysteroid-Peak funktionell zusammenhängen und die Ergebnisse von Kapbienen-Arbeiterinnen übertragbar sind, dann sollte auch bei der Königin die Apolysis vor der Pigmentierung von Augen und Cuticula erfolgen und somit früh in der Puppen-

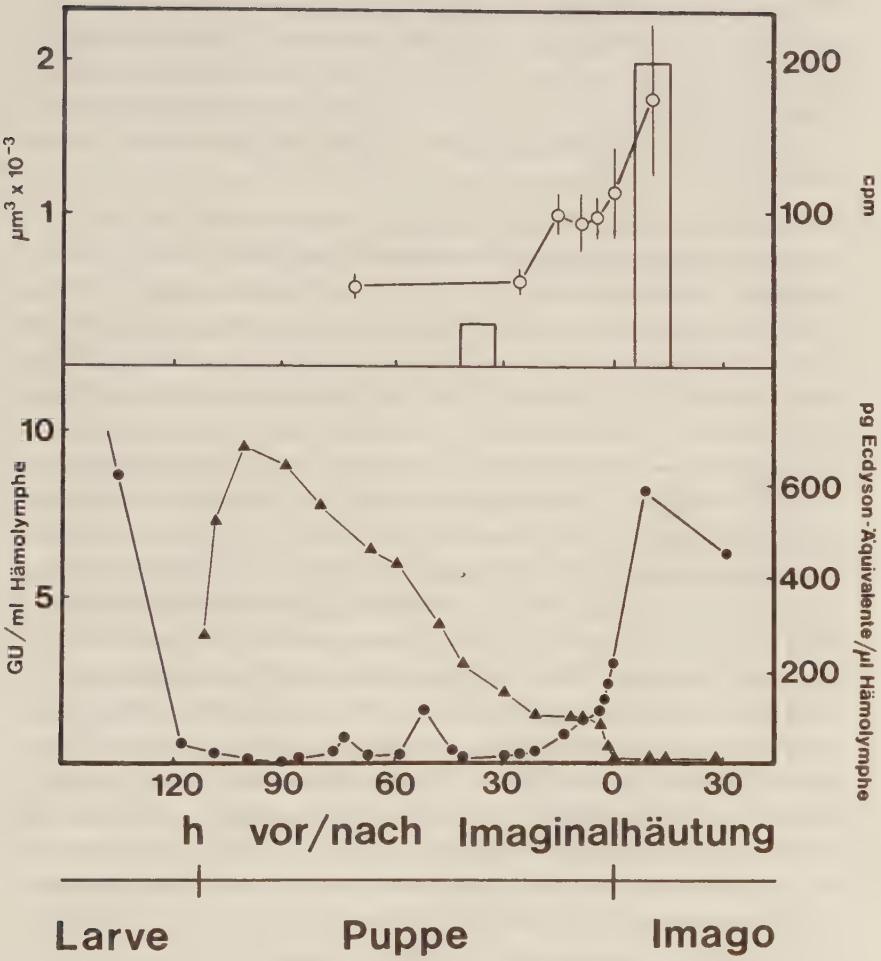



Abb. 31 Juvenilhormon- und Ecdysteroid-Hämolymphtiter, JH-Biosynthese und Volumen der Corpora allata während der Metamorphose der Bienenköniginnen.

Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Parameter zum Endocrinum der Königinnen: ●= JH-, ▲= Ecdysteroid-Titer, ○= CA-Volumen und JH-Biosynthese (Histogramm).

phase auch ein Ecdysteroid-Peak zu erwarten sein. Dementsprechend wäre die eigentliche Puppenphase bei Königinnen sehr kurz und man müßte bei Tieren mit gerade pigmentierten Augen strenggenommen schon von pharat adulten Königinnen sprechen. Nach dem Peak nimmt der Ecdysteroid-Titer in der Puppenphase allmählich ab und erreicht vor der Imaginalhäutung ein Plateau, ehe er während der letzten 10 Stunden vor der Imaginalhäutung auf Konzentrationen von $2 \times 10^{-8}$M absinkt (vgl. Abb. 31).

Der von mir gemessene Verlauf des Ecdysteroid-Titers entspricht nur teilweise den für Bienenköniginnen vorliegenden Daten (LENSKY et al., 1978; HAGENGUTH und REMBOLD, 1978). Gemeinsam ist allen drei Arbeiten, daß früh in der Puppenentwicklung ein Ecdysteroid-Peak gefunden wurde. Für die weitere Pharat-Adult-Entwicklung fehlen bei LENSKY et al. Messungen, während HAGENGUTH und REMBOLD nach dem Anstieg des Ecdysteroid-Titers keine Abnahme feststellen konnten. Die Unterschiede der Bestimmungen könnten auf der einen Seite methodisch begründet sein: HAGENGUTH und REMBOLD verwendeten in ihrem Radioimmunoassay ein Antiserum von SPINDLER et al. (1978), dessen Bindungsspezifität für Ecdyson ($K_D$=5,8 x $10^{-10}$M) etwa doppelt so hoch ist wie für 20-OH-Ecdyson ($K_D$=2,07 x $10^{-9}$M). Das von mir verwendete Antiserum stammt von HORN et al. (1976) und bindet Ecdyson ($K_D$=1,43 x $10^{-10}$M) und 20-OH-Ecdyson spezifischer als das von SPINDLER et al. (1978) (vgl. REUM und KOOLMANN, 1979) und bindet Ecdyson etwa 8,7 mal besser als 20-OH-Ecdyson (HIRN und DELAAGE, 1980). Von größerem Gewicht dürfte noch die Tatsache sein, daß es sich bei den Daten von HAGENGUTH und REMBOLD um Ganzkörperextrakte handelt. Da sie versäumten, die Ecdysteroide vor dem Radioimmunoassay so zu reinigen, daß Konjugate nicht mitgemessen werden (MORGAN and POOLE, 1976), könnte der von ihnen gemessene Ganzkörper-Gehalt auch auf eben diese Metabolite des Ecdysterons zurückzuführen sein.

Auf der anderen Seite spricht noch ein physiologisches Argument gegen die Ergebnisse von HAGENGUTH und REMBOLD (1978): Das Eclosionshormon, das den Häutungsprozeß der Imago triggert, wird nur dann in den Neurosekretorischen Zellen produziert und ausgeschüttet, wenn kein bzw. wenig Ecdyson/Ecdysteron mehr in der Hämolymphe vorliegt. Kurz vor der prospektiven Imaginalhäutung mit Ecdysteron behandelte pharat adulte Schmetterlinge können sich nicht häuten(TRUMAN, 1981). Demnach sollte kurz vor der Imaginalhäutung nur noch eine niedrige Konzentration an Ecdyson in der Hämolymphe vorliegen, wie es bei meinen Daten der Fall ist. Bisher ist die Existenz eines Eclosionshormons bei Honigbienen allerdings noch nicht bewiesen.

Außerdem entspricht der Verlauf des Ecdysteroid-Titers in der Puppenentwicklung der Königin qualitativ dem bei holometabolen Insekten gefundenen generellen Schema, in dem normalerweise ein einzelner Peak schon im ersten Drittel bis zur Hälfte des Zeitraums zwischen Puppen- und Imaginalhäutung auftritt (HSIAO et al., 1976; HODGETTS et al., 1977; BOLLENBACHER et al., 1978; DELBECQUE et al., 1978; HWANG-HSU et al., 1979; BRIERS und DE LOOF, 1980; KOOLMANN, 1980; HANDLER, 1982). Der einzelne Peak induziert wahrscheinlich u.a. die Apolyse der pupalen und die Bildung der imaginalen Cuticula (RIDDIFORD, 1980). Doch ist dieser Zusammenhang noch nicht umfassend aufgeklärt, da es auch Einzelbefunde gibt, wo Apolyse und Anstieg des Ecdysteroid-Titers nicht kongruent verlaufen, indem die Apolyse schon vor dem Ecdysteroid-Peak erfolgt (DELBECQUE et al., 1978; DELACHAMBRE et al., 1980).

ECDYSTEROID-TITER BEI IMAGINES

Das Vorkommen von Ecdsteroiden bei adulten Bienen wäre vor 10 Jahren noch ein überraschender Befund gewesen, weil der Syntheseort für Ecdyson, die Prothorax-Drüse, im Laufe der Puppen- und frühesten Imaginalentwicklung degeneriert (LUKOSCHUS, 1956). Nach dem ersten überraschenden Befund über die Rolle von Ecdysteroiden als gonadotropen Hormonen bei Aedes (HAGEDORN, 1974; FALLON und HAGEDORN, 1974) haben sich die Untersuchungen auf diesem Gebiet vervielfacht, und man kann heute feststellen, daß Ecdyson bei vielen Insekten-Gruppen in der Imago eine physiologische Rolle spielt. Der Titer von 1 - 3 x $10^{-8}$ M/l bei adulten Bienen ist verglichen mit dem physiologisch wirksamen Titer von 1,4 x $10^{-6}$ M/l bei Puppen sehr niedrig. Doch müssen sich wirksame Hormon-Konzentrationen bei verschiedenen Target-Geweben nicht gleichen. Es gibt in jüngerer Zeit vielmehr Hinweise bei einigen Insekten, daß auch Ecdysteroid-Konzentrationen von $10^{-8}$ M/l noch physiologische Wirkungen ausüben - Hormon-Konzentrationen, die bisher nur bei Vertebraten als wirksam galten. So wird z.B. bei der Schabe Nauphoeta (IMBODEN et al., 1978) die Corpora allata-Aktivität kontrolliert, bei Dipteren (Sarcophaga bullata, BRIERS und DE LOOF, 1980; Calliphora vicina, KOOLMANN et al., 1979; Musca domestica, ADAMS, pers. Mittl.) die Ovarentwicklung und Vitellogenin-Synthese durch entsprechend niedrige Konzentrationen beeinflußt.

Die Frage, woher die Ecdysteroide bei den adulten weiblichen Bienen stammen, ist noch ungeklärt. Die Ovarien könnten bei den eierlegenden Königin-

nen, bei denen der höchste Titer nachgewiesen wurde, als Quelle in Betracht kommen. Denn es gibt mittlerweile eine Vielzahl an Hinweisen, daß Ecdysteroide der Hämolymphe aus den Ovarien stammen (vgl. Übersicht HAGEDORN, 1984). Gesichert ist bei Locusta, daß die Follikelepithel-Zellen gegen Ende der Oogenese Ecdysteroide in freier (HOFFMANN et al., 1980) und in konjugierter Form (LAGUEUX et al., 1985) in die Oocyte sezernieren. Dort werden sie, in konjugierter Form an Vitellin gebunden und in den Dotterschollen gespeichert (LAGUEUX et al., 1981). Sie dienen als Hormonquelle für die embryonalen Häutungen. HOFFMANN bezweifelt noch heute die physiologische Aktivität und Signifikanz der Ecdysteroide in der Hämolymphe und erklärt ihr Auftreten als eine Fehlfunktion der Ovarien, indem ein Teil der Ecdysteroide entlang des Konzentrations-Gradienten in die Hämolymphe diffundiert. Doch treten auch in der Hämolymphe weiselrichtiger Arbeiterinnen, deren unentwickelte Ovarien wahrscheinlich kaum als Ecdysteroid-Quelle in Betracht kommen,Spuren RIA-aktiver Substanzen auf (Tab. 11). Auch andere Gewebe sind zur Ecdyson-Synthese fähig. Ecdyson könnte z.B. auch von den Oenocyten gebildet worden sein (ROMER et al., 1974), obwohl deren Befunde bisher von niemand anders verifiziert werden konnten. Potentiell scheinen sogar viele ectodermale Gewebe in der Lage, Ecdyson zu bilden. Dies ist z.B. bei Dermestes der Fall, wenn dessen Prothoraxdrüse als Quelle ausfällt (DELBECQUE und SLAMA, 1980).

### 3.2. Juvenilhormon

Die Veränderungen des Juvenilhormon-Titers im Verlauf der Ontogenese der Bienenkönigin wurden mit dem Galleria-Bioassay gemessen. Die von mir bestimmte Nachweisempfindlichkeit von 10,6 pg JH III/GU stimmt mit den publizierten Daten anderer Labors überein. So berichteten RÖSELER und RÖSELER (1978) von 8,4 pg JH III/GU, FLURI et al. von 10 pg (1981) bzw. 8 pg (1982), und BÜHLER et al. (1983) von 8 pg JH III/GU.

JUVENILHORMON-TITER DER KÖNIGINNENPUPPEN

Über den JH-Titer während der Puppenentwicklung von Bienenköniginnen liegen außer den hier dargestellten Daten (III.2.1.) nur noch GC-MS-Analysen von Ganzkörper-Extrakten vor (REMBOLD und HAGENGUTH, 1981). Der An-

stieg des JH-Titers bei Pharat-Adulten wurden von ihnen nicht gemessen. Ansonsten stimmen die Ergebnisse einigermaßen überein. Da die für die Physiologie relevante Konzentration die der zirkulierenden Hämolymphe ist, weil nicht von einer gleichmäßigen Verteilung des Juvenilhormons im Insekt ausgegangen werden kann (GILBERT et al., 1980; DE KORT und GRANGER, 1981), dürfte der Hämolymph-Titer eher die tatsächlichen physiologischen Verhältnisse widerspiegeln. Im Übrigen entspricht er dem bei Holometabolen zu erwartenden Muster. So treten auch bei Galleria während der Puppenphase kleine Aktivitätspeaks und ein Peak vor der Imaginalhäutung auf (PLANTEVIN et al., 1984). Der Verlauf bei Leptinotarsa ist ganz ähnlich (DELEURANCE et al., 1980). Insgesamt liegen bisher jedoch nur wenige vollständige JH-Titerbestimmungen vor (PLANTEVIN et al., 1984).

Der Verlauf des Titers läßt sich folgendermaßen interpretieren (vgl. auch Abb. 31):
Der hohe Juvenilhormon-Titer vor der Puppenhäutung verhindert wahrscheinlich eine vorzeitige adulte Differenzierung u.a. der Imaginalscheiben. Bei Manduca führt Allatektomie im 5. Larvenstadium zum Erscheinen adultoider Strukturen (KIGUCHI und RIDDIFORD, 1978). Möglicherweise hängt der JH-Peak auch mit der Regulation der Ecdyson-Synthese zusammen (MAUCHAMP et al., 1979). Mit dem niedrigen JH-Titer am Anfang der Puppenphase fällt der Ecdysteroid-Peak zeitlich zusammen (vgl. auch Abb. 31). Über die Rolle der kleinen JH-Aktivitätspeaks in der Mitte der Puppenentwicklung kann nur spekuliert werden, wenn sie überhaupt auf JH-Synthese und nicht auf die Freisetzung juvenoider Substanzen bei der Histolyse larvaler Gewebe zurückzuführen sind. Denn es gibt bisher keine Experimente über die physiologische Funktion pupaler JH-Peaks. Vielleicht stehen sie in Verbindung mit der Regulation der Ecdyson-Synthese, denn später in der pharat adulten Entwicklung erscheint ein Ecdysteroid-Plateau kurz vor der Imaginalhäutung, das mit dem Anstieg des JH-Titers in der Hämolymphe einhergeht. Sobald der Ecdysteroid-Titer stark abfällt, steigt der JH-Titer in der Hämolymphe stark an. Es ist durchaus denkbar, daß sich die Titer wechselseitig beeinflussen, was für die JH-Biosynthese durch Ecdysteron bei der Schabe Diploptera belegt werden konnte (STAY et al., 1980).

JUVENILHORMON-TITER DER IMAGINES

Bei den untersuchten Imaginalstadien bleibt der JH-Titer in der Hämolymphe hoch. Der JH-Titer eierlegender und nicht eierlegender Königinnen unterscheidet sich im Übrigen nach FLURI et al. (1981) nicht. Allerdings wur-

den die Tiere vor ihrer Präparation z.T. mehr als einen Tag lang im Käfig transportiert. Dadurch dürfte die JH-Biosynthese beeinträchtigt worden sein (vgl. III.2.1.5.) und damit auch der vor allem von der Synthese abhängige Titer (DE KORT und GRANGER, 1981). Dies könnte auch der Grund für den bei FLURI et al. um 60% niedrigeren JH-Titer eierlegender Königinnen als bei meinen Bestimmungen sein.

VERGLEICH DER JUVERILHORMON-KONZENTRATIONEN

Um die von REMBOLD und HAGENGUTH (1981) gemessenen Ganzkörper-Gehalte an JH mit dem Hämolymphtiter vergleichen zu können, wird der JH Titer exemplarisch für L5-Larven und frisch geschlüpfte Königinnen in JH-Gehalt pro Tier umgerechnet. L5-Larven kurz vor der Verdeckelung ihrer Zellen haben ungefähr ein Gewicht von 270 mg, frisch geschlüpfte Königinnen 220 mg (WANG, 1965; WEISS, 1974). Aus den Ganzkörpergehalten (50 ng/g, L5; 1 ng/g Jungkönigin) ergeben sich 13,5 ng/L5-Larve und 0,22 g/ Jungkönigin. Der Hämolymph-Titer von 217 ng JH/ml bei Larven entspricht bei einem Hämolymphvolumen von ca. 100 µl etwa 21 ng/L5-Larve und damit grob dem Wert von REMBOLD und HAGENGUTH, während der umgerechnete Hämolymphtiter von 78,2 ng/ml bei Jungköniginnen (ca. 50 µl Hämolymphe/ Tier) mit 4 ng JH/Tier um mehr als eine Zehnerpotenz größer ist als der aus dem Ganzkörpergehalt ermittelte Wert. Diese Diskrepanz ist mir unerklärlich, wurden doch die Hämolymphtiter-Werte in ihrer Größenordnung von FLURI et al.(1981) bestätigt. Zudem entsprechen die JH-Gehalte der Hämolymphe adulter Arbeiterinnen größenordnungsmäßig dem der Königinnen: 0,8-10 ng/ml (BÜHLER et al.; 1983), 11,9-21 ng/ml (FLURI, 1977) 13 und 24 ng/ml (FLURI et al., 1982) und 16,4-190 ng/ml (RUTZ et al., 1976).

Wenn man ferner die gemessenen Titer in Molaritäten transformiert, ergeben sich 800 nM bei L5-Larven und 290 nM bei 1 d Königinnen. Der erstere ist der bisher höchste bei Larven gefundene Titer, bei anderen Insekten erreicht er sonst z.B. 2 nM (Pieris, VARJAS et al., 1976), 60 nM (Manduca, FAIN und RIDDIFORD, 1975) und 280 nM (Rhodnius, BAEHR et al., 1978). In adulten Weibchen werden generell höhere Titer gefunden: 155 nM bei Locusta (BERGOT et al., 1981b), 330 nM bei Leptinotarsa (DE KORT et al., 1982). Sie entsprechen also dem Titer der Königinnen.

### 3.3. JH-Biosynthese bei Bienenköniginnen

Die gemessene JH-Syntheseaktivität der Corpora allata beider untersuchter Königinnen-Entwicklungsstadien spiegelt den bestimmten JH-Hämolymph-Titer in qualitativer Hinsicht eindrücklich wider (vgl.III.2.1. und Abb. 31): Die Corpora allata frisch geschlüpfter Jungköniginnen synthetisieren Juvenilhormon und der Juvenilhormon-Titer ist hoch, während bei Königinnenpuppen 44 h vor dem Schlupf sowohl keine JH-Synthese als auch kein JH in der Hämolymphe nachzuweisen sind.

Obwohl weiterhin die Frage im Raum steht, inwieweit die in vitro-Situation real die in vivo-Situation widerspiegelt, können diese Ergebnisse in die Vielzahl übereinstimmender Daten bei anderen Insekten eingereiht werden. Sie weisen daraufhin, daß die in vitro-Syntheseraten von JH mit anderen bekannten physiologischen Parametern korrelieren und als Methode zur Abschätzung der physiologischen Aktivität der Corpora allata offenbar die nach heutigem Kenntnisstand erwarteten Werte liefert (KRAMER and LAW, 1980; WEAVER et al., 1980; GRANGER et al., 1982).

Allerdings fällt auf, daß die Corpora allata frisch geschlüpfter Königinnen trotz der langen Inkubationszeit von 4 1/2 Stunden nur 0,35 pmol/CA-Paar/h synthetisierten. Verglichen mit den bei anderen Insekten gefundenen Syntheseraten ist dies wenig. Nur bei Tenebrio molitor wurden mit 0,8 pmol/CA-Paar/h (WEAVER et al., 1980) ähnliche Werte gefunden, während bei 1 - 3 Tage alten adulten Weibchen von Manduca sexta 6 pmol JH/CA-Paar/h (KRAMER und LAW, 1980), bei Schistocerca gregaria 30 pmol/ CA-Paar/h (TOBE und PRATT, 1975), Periplaneta americana 30 pmol/CA-Paar/H (PRATT et al., 1975) und bei Diploptera punctata - vor allem bei Weibchen, deren terminale Oocyten sich in der Vitellogenese befinden - sogar bis zu 150 pmol/CA-Paar/h (Mittelwert 40 pmol/CA-Paar/h) (TOBE und STAY, 1977) gefunden wurden.

Untersuchungen an Bienenarbeiterinnen (BÜHLER et al., 1983), die mit CC/CA-Komplexen und dem System von PRATT und TOBE (1974) durchgeführt wurden, ergaben ebenfalls sehr niedrige Syntheseraten zwischen 0,1 und 0,5 pmol pro CC-CA-Paar/h, die zudem erheblich schwankten und keinen Zusammenhang zwischen Juvenilhormon-Titer und Synthese erkennen ließen.

Für die niedrigen Syntheseraten könnten folgende Ursachen in Betracht gezogen werden:

1. Das hier verwendete in vitro-System war keinesfalls so optimiert, wie es sich für Fettkörper und Ovar als erforderlich herausgestellt hatte. So wurde - da es für diesen Versuch nur zur Verfügung stand - das Medium TC 199 (MORGAN et al., 1950) mit HANK's Salzlösung verwendet, das eigentlich bei Vertebraten eingesetzt wird. Zwar hat es sich bei mehreren Insekten als vorteilhaft herausgestellt: Bei der Wüstenheuschrecke Schictocerca gregaria (PRATT und TOBE, 1974), den Schaben Periplaneta americana (WEAVER et al., 1975) und Diploptera punctata (TOBE und STAY, 1977), und dem Mehlkäfer Tenebrio molitor (WEAVER et al., 1980), hingegen wird auch von gegenteiligen Ergebnissen beim Kartoffelkäfer Leptinotarsa decemlineata (KRAMER , 1978) berichtet. Das heißt, daß eingehendere Studien zu diesem Problemkomplex erforderlich sind - u.a. auch der Vergleich der Syntheseaktivität in TC 199 und im neu entwickelten Honigbienen-in vitro-Medium, sowie der Einfluß des pH auf die Synthese von JH, die bei anderen Insekten in Abhängigkeit vom pH stark variiert (WEAVER et al., 1980).

2. Es ist bekannt, daß die Corpora allata reproduktiv aktiver Weibchen ihre spontane Aktivität, JH zu synthetisieren, nach 3 bis 36 h Inkubation in vitro verlieren (PRATT et al., 1975; TOBE und STAY, 1977; WEAVER et al., 1980). Das kann bedeuten, daß die bei Bienen gewählte Inkubationszeit zu lang war und erfordert zukünftig die Bestimmung einer Kinetik der Inkorporation von $^{14}$C-Methionin, ebenso wie die Optimierung des Angebots an der Aminosäure, damit die Synthesekapazität der Corpora allata voll ausgeschöpft werden kann.

3. PRATT und TOBE (1974) beschreiben, daß die Corpora allata dann ihre volle Synthesekapazität erreichen, wenn exogen im Medium Sesquiterpenoid-Säuren, insbesondere Farnesolsäure, als direkte Vorläufer angeboten werden. Gleichzeitig muß aber erwähnt werden, daß qualitativ keine anderen Ergebnisse erhalten wurden (PRATT und TOBE, 1974; TOBE und PRATT, 1975). Außerdem kommt der Vorläufer im Biosyntheseweg nur in den Corpora allata selber vor und wird dort synthetisiert (TOBE und STAY, 1977; KRAMER und LAW, 1980). Bei Bienenarbeiterinnen konnte die Syntheseaktivität durch die Zugabe von Farnesolsäure nicht gesteigert werden (BÜHLER et al., 1983).

JH-BIOSYNTHESE GEKÄFIGTER BIENENKÖNIGINNEN

Überraschend ist die Tatsache, daß bei gekäfigten Königinnen, obwohl sie sich im Volk befinden, schon nach 4 h die JH-Synthese ihrer Corpora allata um 60 % reduziert und nach 12 h nicht mehr nachweisbar ist. Vergleichbare Ergebnisse bei anderen Insekten liegen bisher nicht vor. Offensichtlich wird das Endokrinum eines Sozialen Insekts durch Eingriffe in seine Lebensweise erheblich beeinflusst. Dies läßt außerdem die publizierten Ergebnisse zur JH-Synthese adulter Bienenarbeiterinnen (BÜHLER et al., 1983) in neuem Licht erscheinen: Die Autoren konnten keine Unterschiede in der JH-Syntheseaktivität bei verschieden lang künstlich unter Brutschrankbedingungen mit einer Königin und ca. 1 000 Individuen auf einer Wabe gesperrten Sommer- bzw. Winterbienen feststellen. Auch korrelierten JH-Synthese und JH-Titer nicht miteinander. Auf dem Hintergrund der Ergebnisse bei gekäfigten Jungköniginnen könnten die künstliche Versuchsbedingungen die niedrigen und schwankenden Syntheseraten bei Arbeiterinnen erklären. Generell läßt sich daraus erneut die Forderung ableiten, daß bei Versuchen mit sozialen Insekten experimentelle Zugriffe unter möglichst natürlichen Bedingungen bzw. in kürzester Zeit nach Entnahme eines Individuums aus dem "normalen Volk" geschehen sollten.

### 3.4. Volumen der Corpora allata

Während der Puppenzeit steigt bei den Königinnen das Volumen der Corpora allata, während das CA-Volumen bei Arbeiterinnen in der gleichen Entwicklungsphase unverändert bleibt (LUKOSCHUS, 1956). Die Volumen-Veränderungen während der Metamorphose konnten u.a. auch bei den Holometabolen Pieris (KAISER, 1949), Ephestia (REHM, 1951) und Panorpa (SCHWINCK, 1951) beobachtet werden. In der Imaginalentwicklung nimmt dagegen das Drüsenvolumen bei Arbeiterinnen zu, während es bei Königinnen nach dem Schlupf konstant bleibt (LUKOSCHUS, 1956; GAST, 1967; VAN LAERE, 1971). Dieser Trend wird durch meine Daten bestätigt. Außerdem korreliert die Volumen-Zunahme der Corpora allata 15 h vor der Imaginalhäutung mit dem JH-Titeranstieg in der Hämolymphe. Zugleich bedeutet die Vergrößerung der CA frisch geschlüpfter Königinnen auch gesteigerte Syntheseaktivität. Alle drei untersuchten Parameter stimmen also in dieser Entwicklungsphase überein (vgl. Abb. 31). Allerdings bedeutet Volumen-Zunahme nicht generell physiologische Aktivität der Drüsen (TOBE und PRATT, 1975; RÖSELER,

1977). Zwar reflekiert das konstante CA-Volumen imaginaler Königinnen den konstanten JH-Titer und korrelieren bei Arbeiterinnen während der ersten zehn Imaginaltage JH-Titer und CA-Volumen (RUTZ et al., 1976; FLURI et al., 1982), doch nimmt auf der anderen Seite das CA-Volumen bei Flugbienen ab, während ihr JH-Titer weiterhin steigt (RUTZ et al., 1976; FLURI et al., 1982).

## 4. Initiation der Vitellogenin-Synthese und ihre Kontrolle

Aufgrund der Charakterisierung der pupalen Entwicklungsstadien und der während der Metamorphose herrschenden Hormontiter sowie der Identifikation des Vitellogenins konnte die Veränderung des Hämolymphproteinmusters während der Metamorphose und die Initiation der Vitellogeninsynthese gezielt näher untersucht werden.

### MUSTER UND SYNTHESE DER HÄMOLYMPHPROTEINE WÄHREND DER METAMORPHOSE

Die Analyse der Veränderungen des Hämolymphproteinmusters via SDS-Elektrophorese, Fluorographie, Hämolymphproteinsynthese-Bestimmung und indirekter Immunopräzipitation zeigte, daß es typisch larvale, typisch imaginale und solche Hämolymphproteine gibt, die sowohl bei Larven wie bei Imagines vorkommen. Dies trifft generell für Insekten zu (WYATT, 1980). Mit diesen Methoden konnten keine spezifisch pupalen Hämolymphproteine nachgewiesen werden. Auch dies entspricht dem allgemeinen Bild der Serumprotein-Muster bei Insekten. Die Veränderung des Hämolymphproteinspektrums läßt sich exemplarisch anhand zweier bekannter Hämolymphproteine darstellen (vgl. Abb. 32).

Ein typisch larvales Hämolymphprotein (72,5 K), das in Larvenstadien die höchste Konzentration aller Hämolymphproteine besitzt, wird bei Bienen am Ende der Larvenentwicklung schon nicht mehr synthetisiert. Seinem Molekulargewicht und seiner Konzentration nach könnte es sich um das Arylphorin handeln. Arylphorine sind hexamere larvale Haupt-Hämolymphproteine mit ungewöhnlich hohem Anteil an aromatischen Aminosäuren (RIDDIFORD and LAW, 1983), die als Reserveproteine während der Metamorphose zum Aufbau adulter Gewebe dienen. Sie sind bisher bei Dipteren (MUNN et al., 1971), Lepidopteren (TELFER et al., 1983) und Hymenopteren, nämlich bei Apis (74 K, RYAN et al., 1984), gefunden worden. Wahrscheinlich ist das Poly-

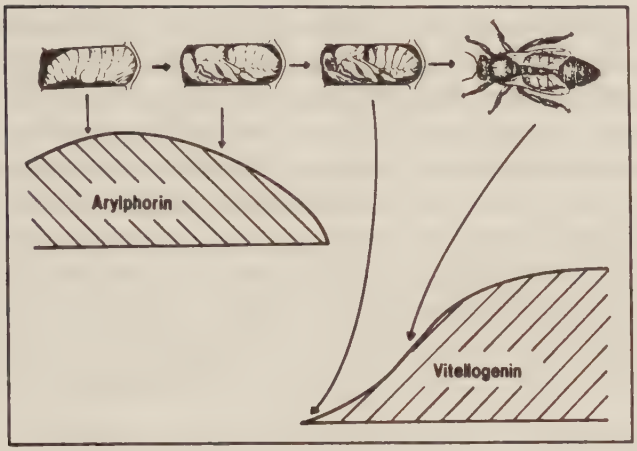



Abb. 32 Veränderung des Hämolymphprotein-Musters während der Metamorphose der Bienenkönigin am Beispiel von Arylphorin und Vitellogenin.

Erläuterungen s. Text

peptid von 72,5 K mit dem von RYAN et al. identisch, obwohl ein eindeutiger immunologischer Nachweis noch fehlt.

Im gleichen Entwicklungszeitraum, in dem bei Bienenköniginnen die Konzentration des Arylphorins in der Hämolymphe kontinuierlich abnimmt, sinkt auch die Synthese der Hämolymphproteine. 24 h vor der Imaginalhäutung erreicht sie ihr niedrigstes (Null-?) Niveau und bleibt für mehrere Stunden entsprechend niedrig. Etwa 10,5 h vor der Imaginalhäutung beginnt die de novo-Synthese von Vitellogenin und nimmt dann innerhalb weniger Stunden stark zu. Offenbar ist Vitellogenin ein spezifisch imaginales Syntheseprodukt des aus abdominalen Histoblastzellen (BISHOP, 1958) neugebildeten imaginalen Fettkörpers der Honigbienen, zumal gleichzeitig weitere neue Hämolymph-Polypeptide (55 K, 127 K und 149 K, vgl. III.4.3.) synthetisiert werden. Arylphorin und Vitellogenin können also als typische Beispiele für die Umwandlung des larvalen in das imaginale Funktionsprogramm des Insekten-Fettkörpers aufgefaßt werden.

Auf der einen Seite ist der Befund, daß Vitellogenin schon vor der Imaginalhäutung synthetisiert wird, für Insekten recht ungewöhnlich. Nur wenige Arten sind bekannt, bei denen Vitellogenin schon vor der eigentlichen Imagi-

nalhäutung synthetisiert wird : Hyalophora (PAN et al., 1969), Bombyx (ONO et al., 1975) und Drosophila (KAMBYSELLIS, 1977; POSTLETHWAIT und KASCHNITZ, 1978). Bei den meisten Insekten erfolgt seine Initiation erst nach der Imaginalhäutung (vgl. HAGEDORN und KUNKEL, 1979; ENGELMANN, 1979; 1980). Auf der anderen Seite reihen sich Honigbienen unter alle anderen Insekten ein, weil Vitellogenin eben typischerweise hier ein Produkt des imaginalen Fettkörpers ist. Auch bei Hyalophora, bei der sogar die Vitellogenese schon vor der Imaginalhäutung fast abgeschlossen ist, beginnt die Vitellogeninsynthese erst nach der Pupal-Imaginal-Apolysis (PAN et al., 1969). D.h. auch hier kann vermutet werden, daß Vitellogenin ein Produkt des imaginalen Funktionsprogramms des Fettkörpers ist.

KONTROLLE DER INITIATION DER VITELLOGENIN-SYNTHESE

Dabei stellt sich zugleich die Frage nach der Kontrolle dieser Prozesse. Die Serie von Dekapitations-, Allatektomie- und JH-Applikations-Experimenten während der Puppenentwicklung der Königinnen lassen nur folgenden Schluß zu: Die Expression des Vitellogenins als typischem Produkt des imaginalen Fettkörpers ist zu den untersuchten Zeitpunkten unabhängig von JH und anderen Faktoren des Gehirns.[1*]

Trotzdem bleibt festzuhalten, daß

a. Dekapitation weißäugiger Puppen die Synthese imaginaler Hämolymphproteine verhindert,
b. die Vitellogeninsynthese dekapitierter und allatektomierter Puppen niedriger als die unbehandelter ist,
c. Juvenilhormon-Applikation 34 h vor der prospektiven Imaginalhäutung, d.h. zum einem Zeitpunkt, an dem es in der Normogenese noch nicht auftritt (vgl. III.2.), die Vitellogenin-Synthese um das Doppelte steigert, wenn die Königinnen zu dem Zeitpunkt präpariert werden, an dem Vitellogenin erstmalig in der Hämolymphe nachweisbar ist.

Diese Phänomene können dadurch erklärt werden, daß

1. zwischen den Puppenstadien P1 und P3 ein Entwicklungsereignis stattfindet, das für die Synthese imaginaler Hämolymphproteine von besonderer

1* Sehr kritische Leser mögen einwenden, daß der Antikörper bei den Puppen andere markierte Hämolymphproteine statt Vitellogenin unspezifisch bindet. Wäre dann aber in der Normogenese Vitellogenin erstmalig an einem bestimmten Zeitpunkt mit dem Assay nachweisbar gewesen?

Bedeutung ist. Da im gleichen Entwicklungszeitraum normalerweise ein Ecdysteroidpeak in der Hämolymphe auftritt (vgl II.2.2.), könnte die Dekapitation die Sekretion der Ecdysteroide verhindert haben, weil die Corpora cardiaca als Sekretionsort des PTTH entfernt worden waren. Das könnte zugleich bedeuten, daß der Ecdysteroid-Stimulus an der Differenzierung des imaginalen Fettkörpers beteiligt ist.

Ecdysteroide könnten dabei zwei Rollen in Analogie zu Untersuchungen an der Epidermis spielen: Nach dem "klassischen Schema" (HERRMANN, 1969) der hormonellen Steuerung der postembryonalen Entwicklung der Insekten könnte Ecdysteron in Abwesenheit von Juvenilhormon die Determination der imaginalen Fettkörperentwicklung steuern (Epidermis: RIDDIFORD, 1981). Oder Ecdysteron würde nach einer kontroversen Theorie nur noch das Differenzierungsprogramm des Fettkörpers im Sinne differentieller Genaktivierung (KARLSON, 1980) anschalten, dessen morphogenetisch-funktionelle Veränderungen sich aber schon zuvor unabhängig von der Ecdysteron-Wirkung vollzogen hatten (KUMARAN, 1981; WILLIS, 1981). Jüngere Untersuchungen an Galleria-Puppen (WOLBERT, 1984) stützen die zweite Hypothese, denn aus dem räumlich-zeitlichen Muster des Verlustes an JH-Sensitivität der Epidermiszellen läßt sich die sukzessive Determination der Epidermis für die Imaginalentwicklung ablesen, die teilweise schon abgeschlossen ist, bevor Ecdyson in der Hämolymphe erscheint. Kürzlich veröffentlichte Studien zur Neusynthese epidermaler Proteine bei Manduca (KIELY und RIDDIFORD, 1985) während der Larven-Puppen-Transformation lassen erkennen, daß einerseits spezifische Proteine während der pupalen Differenzierung der Epidermis unabhängig von einem Ecdyson-Stimulus, offenbar aufgrund eines internen Entwicklungsprogramms, synthetisiert werden und andererseits andere epidermale Proteine dagegen nur auf den hormonellen Stimulus hin synthetisiert werden. Zwar sind die Funktionen der meisten neusynthetisierten Proteine noch unbekannt, doch es kann angenommen werden, daß keines der o.a. Modelle der hormonellen Steuerung der postembryonalen Entwicklung ausschließlich zutrifft. Entsprechende Untersuchungen zur Differenzierung des Fettkörpers holometaboler Insekten fehlen bislang noch, während die Differenzierung des Fettkörpers hemimetaboler Insekten kein Alles-oder-Nichts-Prinzip, sondern eine graduelle Zunahme der Kompetenz zur Synthese imaginaler Hämolymphproteine umfasst (KUNKEL, 1981; DHADIALLA und WYATT, 1983). Wenn die imaginale Differenzierung des Fettkörpers der Honigbiene nach letzterem Modell verliefe, würde der Zeitpunkt seiner Determination noch weiter am Anfang der Metamorphose liegen und zugleich

die Frage der Kastenspezifischen Differenzierung als Folge der unterschiedlichen Entwicklung des endocrinen Systems (REMBOLD und HAGENGUTH, 1981) einschließen. Bisher haben bei Untersuchungen zur kastenspezifischen Entwicklung immer nur die äußeren morphologischen Charakteristika sowie die Entwicklung von endokrinem System und Ovar im Vordergrund gestanden. Der Fettkörper sollte zukünftig auch einmal unter diesem Aspekt mit betrachtet werden. Zumal Fettkörper imaginaler Drohnen langsamer degenerieren, wenn sie als L5-Larven bzw. weißäugige Puppen mit JH III behandelt worden waren (PAULINO SIMOES, 1984).

Auf der anderen Seite könnte der Effekt der Dekapitation weißäugiger Puppen schlicht dadurch hervorgerufen worden sein, daß durch die mehrtägige Phase zwischen Dekapitation und Präparation so starke Entwicklungsstörungen auftraten, daß der Fettkörper seine Funktion nicht mehr entsprechend ausüben konnte.

2.
sich der imaginale Fettkörper in der Pharat-Adultentwicklung (wie die Cuticula *) unabhängig von Faktoren des Kopfes entwickelt. Seine Protodifferenzierung wäre daher ein autonomer, endogen gesteuerter Prozeß und schlösse die Expression des Vitellogenins ein. Diese Annahme wäre dann unzutreffend, wenn sich hinter dem Plateau des Ecdysteroid-Titers am Ende der Pharat-Adultentwicklung einen kleiner Anstieg des Ecdsteron-Titers verbergen würde, und wenn dieser eine Rolle für die Initiation der Vitellogenin-Synthese spielte. Ein solcher Zusammenhang zwischen Ecdysteroid-Peak kurz vor der Imaginalhäutung und der Initiation der Dotterbildung wurde nämlich bei weiblichen Galleria-Puppen nachgewiesen (PLANTEVIN et al., 1984).

3.
Juvenilhormon während einer definierten kritischen Entwicklungsphase die Differenzierung des Fettkörpers beeinflusst. Denn einerseits ist es für die Expression des Vitellogenins im Fettkörper nicht verantwortlich, andererseits steigert es die Vitellogenin-Synthese, wenn es vor dem Zeitpunkt appliziert wird, an dem es normalerweise in die Hämolymphe sezeniert wird, und die Königin zum Zeitpunkt präpariert wird, an dem Vitellogenin in der Normalentwicklung erstmalig nachweisbar ist. Spätere JH-Appli-

* Auch die Cuticula benötigt offenbar im gleichen Entwicklungszeitraum keine Kopffaktoren für ihre weitere Differenzierung. Lediglich die letzte Pigmentierung und evtl. Sklerotisierung findet nicht statt, weil sie vermutlich vom neurosekretorischen Hormon Bursicon abhängig sind.

kationen und Präparationszeitpunkte verändern die Vitellogenin-Syntheserate nicht mehr. D.h. der Fettkörper ist zum Zeitpunkt der Applikation 34 h vor der mutmaßlichen Imaginalhäutung kompetent, auf JH zu reagieren, obwohl JH erst später synthetisiert wird. Zur Aufklärung dieser Zusammenhänge tragen publizierte Untersuchungen in letzter Zeit bei, in denen gezeigt wurde, daß JH die Differenzierung des Fettkörpers auf zwei unterschiedliche Weisen beeinflusst:

Erstens kann es die Polyploidisierung des Fettkörpers während seiner imaginalen Differenzierung regulieren, wie z.B. bei Locusta (IRVINE und BRASCH, 1981), Bombyx (CHINZEI und TOJO, 1972), Aedes (DITTMANN et al., 1985). Bei vielen Insektenzellen, wie allgemein bei vielen pflanzlichen und tierischen Zellen, ist die funktionelle Differenzierung erst nach mehreren Endomitosezyklen abgeschlossen (BRODSKY und URYVAERA, 1977). Polyploidie repräsentiert offenbar eine Form der genomischen Differenzierung, durch die spezialisierte Zellen, z.B. Leberzellen (CARRIERE, 1969) und Fettkörperzellen, ihre Biosynthesefunktionen effektivieren. Es ist denkbar, daß JH gerade beim Fettkörper der Bienenkönigin als extrem syntheseaktivem Gewebe die Polyploidisierung triggert.

Zweitens kann es unter JH-Einfluß zur zellulären Differenzierung des Fettkörpers kommen: Der sekretorische Apparat, vor allem das rauhe endoplasmatische Retikulum, wird bei einigen Insekten unter JH-Regulation aufgebaut (LAUJERVAT, 1977; DELLA-CIOPPA und ENGELMANN, 1984). Auch letztere Wirkung könnte JH auf den Fettkörper der Bienenkönigin ausüben.

Zusammengefasst ergibt sich folgende Hypothese: Die Differenzierung des adulten Fettkörpers aus abdominalen, undifferenzierten Histoblastzellen wird durch Ecdyson induziert. Daran schließt sich seine endogen gesteuerte Protodifferenzierung einschließlich der Expression des Vitellogenins an. JH-Applikationen in bestimmten Entwicklungsphasen bzw. der Anstieg des JH-Titers vor der Imaginalhäutung führen zu einer weiteren cytologischen Differenzierung des Fettkörpers (z.B. Polyploidisierung/Proliferation des rauhen endoplasmatischen Retikulums). Dadurch wird seine sekretorische Funktion voll ausgebildet und Vitellogenin kann in hoher Rate synthetisiert werden.

Mit der Annahme einer endogen gesteuerten Protodifferenzierung und JH-abhängigen Differenzierung lassen sich auch die bisherigen Ergebnisse zur Initiation und Regulation der Vitellogenin-Synthese teilweise erklären:

Alle bisher beschriebenen Allatektomie-Experimente fanden an Königinnen nach dem Schlupf statt. Frisch geschlüpft operierte Königinnen waren ebenso in der Lage, Eier zu produzieren (DAERR, 1978b), wie später operierte (HRDY und SLAMA, 1963; VAN LAERE, 1974; ENGELS und RAMAMURTY, 1976; RAMAMURTY und ENGELS, 1977). Die Allatektomie wirkte sich außerdem bei eierlegenden Königinnen auch nur gering auf die Vitellogenin-Synthese aus (RAMAMURTY und ENGELS, 1977). Da der Anstieg des Juvenilhormon-Titers noch vor dem Imaginalschlupf erfolgt, könnten sich die Allatektomie-Experimente deshalb nicht mehr ausgewirkt haben, weil der Fettkörper schon vorher der erforderlichen differenzierenden Wirkung von JH ausgesetzt war und es später für die Aufrechterhaltung der Vitellogenin-Synthese und Oogenese nicht vonnöten ist.

Bei Arbeiterinnen könnten die Ergebnisse von IMBODEN et al. (1976) in gleicher Weise reinterpretiert werden: Allatektomie zum Zeitpunkt des Schlupfes führte dazu, daß Vitellogenin nicht mehr in der Hämolymphe nachweisbar war. Durch JH-Applikation wurde es in der Hämolymphe wieder nachweisbar. Letztere schlossen daraus, daß JH die Vitellogenin-Synthese induziert und kontrolliert, ohne sie seine Synthese allerdings auch untersucht hatten. Ihre Ergebnisse können auch auf Nachweisprobleme zurückzuführen sein, denn offenbar kommt Vitellogenin schon vor der Imaginalhäutung bzw. vor dem Imaginalschlupf in der Hämolymphe vor (BRAUN, 1985). D.h. die Induktion der Vitellogenin-Synthese muß schon vor dem Zeitpunkt der Allatektomie (Imaginalschlupf) erfolgt sein. Die Allatektomie verhinderte dann die Bildung von Juvenilhormon und damit möglicherweise die weitere Differenzierung des imaginalen Fettkörpers, weshalb er seine volle Synthesekapazität nicht erlangte. Dafür spricht auch die zeitliche Koinzidenz zwischen Anstieg des JH-Titers (RUTZ et al., 1976; FLURI et al., 1982) und Vitellogenin-Synthese (BRAUN, 1985) während der ersten Imaginaltage der Arbeiterinnen.

Ähnliches könnte auch für die Drohnen zutreffen, da Vitellogenin zum Zeitpunkt des Schlupfes auch bei Drohnen in Spuren vorkommt (TRENCZEK, 1984), während JH gleichzeitig noch nicht nachweisbar ist (REMBOLD, 1984). Diese Korrelation könnte bedeuten, daß die Expression von Vitellogenin auch bei Drohnen JH-unabhängig ist und daß damit die Protodifferenzierung des imaginalen Fettkörpers in beiden Geschlechtern und Kasten der Honigbiene die Expression des Vitellogenin-Gens beeinhaltet.

Auch Ergebnisse mit anderen Insekten lassen sich teilweise mit dieser Hypothese vereinbaren. So kommt auch bei frisch geschlüpften Hummelköniginnen Vitellogenin schon in der Hämolymphe vor. Seine Konzentration wird durch JH-Applikationen nicht verändert (RÖSELER, 1984), wenngleich die Vitellogenin-Synthese nicht untersucht wurde. Bei Sarcophaga verhindert die Allatektomie zum Zeitpunkt des Schlupfes nur bei 30% aller Tiere das Erscheinen von Vitellogenin in der Hämolymphe (WILKENS, 1969; ENGELMANN et al., 1971). Allatektomie in der Puppe hat ebenso wenig eine hemmende Wirkung. Vitellogenin wird auch bei Drosophila schon vor der Imaginalhäutung synthetisiert (KAMBYSELLIS, 1977; POSTLETHWAIT und KASCHNITZ, 1978) und ist nicht JH-kontrolliert. D.h. auch hier scheint die Expresssion des Vitellogenin-Gens JH-unabhängig zu sein. Ähnliches trifft auch für Hyalophora und Bombyx zu (PAN et al., 1969; ONO et al., 1975). D.h. die Situation bei Honigbienen stellt keinen Spezialfall dar, sondern trifft für eine Reihe von Holometabolen zu, u.a. bei jenen, deren Fettkörper während der Metamorphose eine vollständige Umwandlung erfährt.

Die Differenzierung des Honigbienen-Fettkörpers sollte in zukünftigen Experimenten mit näher untersucht werden. Zwar läßt sich die Hypothese nicht in vivo überprüfen (vgl. III.3.), doch dürfte sie mit dem in dieser Arbeit beschriebenen in vitro-System experimentell bewältigbar werden. Zugleich muß aber versucht werden, die VG-mRNA zu isolieren, um die gewonnenen Ergebnisse weiter experimentell abzusichern.

## 5. Regulation der Vitellogenin-Synthese

### REGULATIONSFAKTOREN

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich bei Bienenköniginnen drei Faktorengruppen erkennnen, die sich auf die Vitellogenin-Synthese auswirken:

1. Differenzierungsgrad der Oocyten und Eilageaktivität

Einerseits ist die Regulation der Vitellogenin-Synthese von der Oogenese partiell unabhängig, denn die Vitellogenin-Synthese steigt schon lange vor dem Hochzeitsflug gleich nach der Imaginalhäutung innerhalb von 10 h um das Doppelte. Diese partielle Unabhängigkeit läßt sich bei Bienen auch aus dem Vorkommen von Vitellogenin bei weiselrichtigen Arbeiterinnen (ENGELS und

FAHRENHORST, 1974; RUTZ und LÜSCHER, 1974) und Drohnen (TRENCZEK, 1984) schließen. Sie dürfte auch für die nahe verwandten Hummeln zutreffen, da auch bei der Hummelkönigin Vitellogenin ebenfalls unabhängig von der Oogenese, insbesondere bei Herbstköniginnen, in der Hämolymphe nachzuweisen ist (RÖSELER und RÖSELER, 1973).

Andererseits korreliert die Vitellogenin-Synthese in späteren Entwicklungsphasen der Königin mit dem Grad der Eilageaktivität. Nach dem Hochzeitsflug nimmt sie nocheinmal um das Dreifache zu (Tab. 15; vgl. auch ENGELS, 1972). Nichteierlegende Königinnen, z.B. im Herbst, haben zwar einen höheren Vitellogenin-Titer aber eine erheblich reduzierte Syntheserate - ohne daß die Vitellogeninsynthese gänzlich unterbunden wird (ENGELS, 1974). Sie bleibt auf einem Niveau, das noch über dem der Königinnen vor dem Hochzeitsflug liegt (Tab. 16, 33). Darüberhinaus variert der Umfang der Vitellogenin-Synthese innerhalb weiter Grenzen in Abhängigkeit von der Eiablagerate (Tab. 34, 39). Interressant sind in diesem Zusammenhang auch Daten zur Vitellogenin-Synthese bei weisellosen Arbeiterinnen (BRAUN, 1985): Sie ist bei denjenigen weisellosen Arbeiterinnen, die vitellogene Follikel besitzen, um etwa 100 % gegenüber weiselrichtigen Arbeiterinnen gesteigert, während die Vitellogenin-Synthese weiselloser Arbeiterinnen ohne dottereinlagernde Follikel nur um etwa 25% erhöht ist. D.h., daß die Vitellogeninsynthese auch mit dem Differenzierungsgrad der terminalen Follikel korreliert ist. D.h. sobald das Wachstum der Follikel einsetzt, steigt auch die Vitellogenin-Synthese.

2. Externe Faktoren

Vitellogenin-Synthese und Oogenese werden durch externe Faktoren wie Hochzeitsflug und Jahreszeit beeinflusst (Tab. 16). So weisen z.B. auch Winterköniginnen Vitellogenin-Syntheseraten auf, die zwischen denen nicht eierlegender und eierlegender Sommerköniginnen liegen (ENGELS, 1974). Sicherlich werden beide Faktoren auch durch das soziale Umfeld beeinflusst, denn z.B. die Produktion von Dotterproteinen als ein Mehrfaches des Körpergewichtes der eierlegenden Königin (ENGELS, 1972) setzt optimale Ernährung durch die Arbeiterinnen voraus.

3. Endokrine Faktoren

Es gibt weiterhin endokrine bzw. humorale Faktoren, die die Vitellogenin-Synthese stimulieren, wie in in vitro-Experimenten mit Königinnen-Fettkörpern (vgl. III.10.) belegt werden konnte:

a. Kopfextrakte eierlegender Königinnen steigern spezifisch die Vitellogenin-Synthese von Fettkörper-Präparationen eierlegender Königinnen, während Drohnen-Kopfextrakte keinen Einfluß haben.
b. Ecdysteron stimuliert in der physiologischen Konzentration von 3 x $10^{-8}$M (vgl. Tab. 12) Protein- und auch Vitellogenin-Synthese.
c. Hämolymphe eierlegender Königinnen, 1 min hitzeinaktiviert und 10%-ig dem Kulturmedium zugesetzt, stimuliert die Vitellogenin-Synthese, während 10 min hitzeinaktivierte Hämolymphe eierlegender Königinnen und ebenso Hämolymphe nichteierlegender Königinnen die VG-Synthese nicht stimuliert.

MODELL DER REGULATION DER VITELLOGENIN-SYNTHESE

Diese Ergebnisse sind zu einem vorläufigen Modell der Regulation der Vitellogenin-Synthese bei Bienen zusammengefasst worden (Abb. 33). Es soll kurz in einigen Details erläutert und diskutiert werden.

OOGENESE UND VITELLOGENIN-SYNTHESE

Der beobachtete Zusammenhang von Oogenese, Follikelstadium und Vitellogenin-Synthese bei Königinnen (Tab. 34,39) und Arbeiterinnen (BRAUN, 1985) erfordert ein Regulationssystem, in dem diese Parameter als Informationen verarbeitet werden und die Vitellogenin-Synthese dementsprechend eingestellt wird. Denkbar ist, daß die Eilageaktivität neuronal perzipiert wird und über das ZNS eine Regulation in Abhängigkeit von der Eilage erfolgt. Naheliegender scheint mir aber zu sein, daß in erster Linie der Parameter "Follikelstadium" selbst in die Regulation der Vitellogeninsynthese eingreift. Gerade die Experimente von BRAUN (1985) an weisellosen Arbeiterinnen liefern dazu wesentliche Argumente, weil die Vitellogenin-Synthese bei ihnen, auch ohne daß sie in Eilage waren, vor allem vom Oogenesestadium der terminalen Follikel abhängt.

Bei Insekten sind drei Systeme des Ovareinflusses auf die Vitellogenin-Syntheseregulation bekannt: Das Ovar produziert, wie z.B. bei Aedes, Hormone (Ecdyson), die die Vitellogenin-Synthese ohne Beteiligung des ZNS direkt stimulieren (HAGEDORN et al., 1975). Oder das Ovar produziert ein oostatisches Hormon (ADAMS, 1970; 1976; PAPPAS und FRAENKEL, 1978), das die Neurosekretorischen Zellen (NSZ) z.B. bei Phormia hemmt, Allatotropine auszuschütten und damit die Produktion von JH als Gonadotropin verhindert. Als drittes sind Dehnungsrezeptoren der Ovariolenhüllen z.B. bei ovoviviparen Schaben (ROTH, 1973) bekannt geworden, die die Vitellogenin-Synthese beeinflussen.

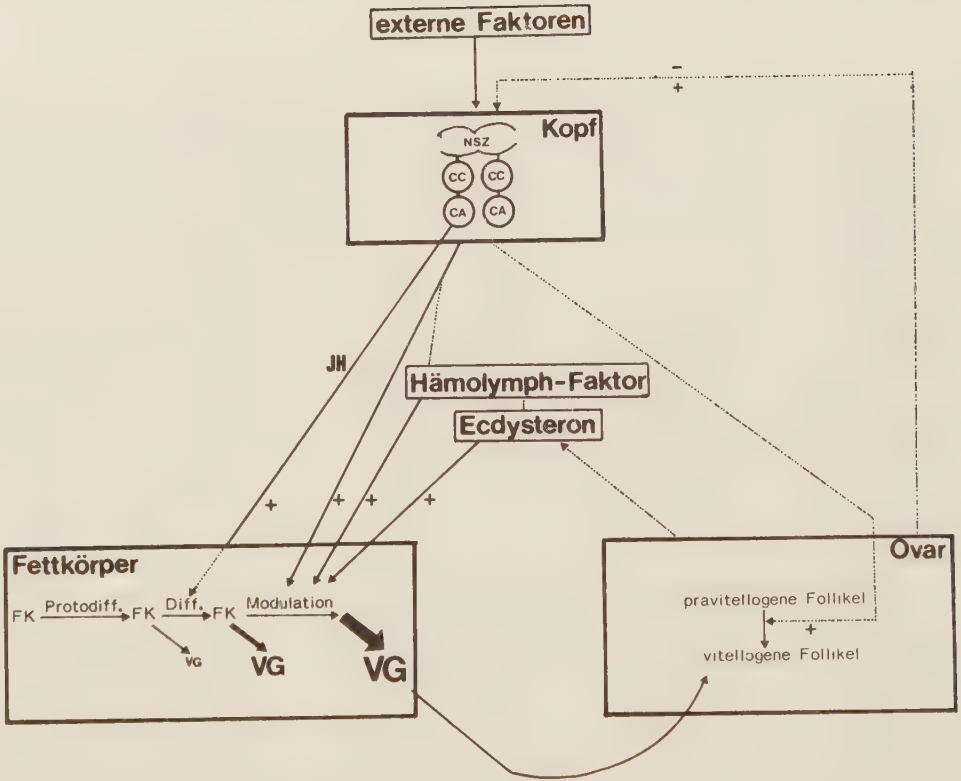



Abb. 33 Modell der Regulation der Vitellogenin-Synthese bei Honigbienen

Gestrichelte Pfeile geben vermutete Zusammenhänge wieder, durchgezogene Pfeile in dieser Arbeit gewonnene Evidenzen. Erläuterungen siehe Text.

Die bisher bei Bienen vorliegenden Ergebnisse können die Frage einer peripheren direkten Kontrolle der Vitellogenin-Synthese durch das Ovar über einen hormonellen Faktor bzw. ihrer zentralen Steuerung nicht beantworten. Koinkubation von Fettkörper und Ovar eierlegender Königinnen in vitro zur Ermittlung der Gesamtsynthese geben keine Hinweise auf einen direkten Einfluß, wenngleich die Proteinsynthese überraschenderweise signifikant niedriger lag. Dies könnte einerseits auf einem Hemmeffekt der Ovarien oder auf einem $O_2$-Mangel für den Fettkörper beruhen, weil die Sauerstoffversorgung den zentralen limitierenden Faktor der in vitro-Kultur darstellt und die Tracheen bei der Koinkubation Ovar und Fettkörper zugleich versorgen müssen.

EXTERNE FAKTOREN

Allerdings kann erwartet werden, daß das ZNS an der Regulation der Vitellogenin-Synthese beteiligt ist, weil externe Faktoren wie Hochzeitsflug und Jahreszeit perzipiert und in humorale Stimuli umgewandelt werden müssen.

NEUROENDOCRINE FAKTOREN

Auch die spezifische Stimulation der Vitellogenin-Synthese durch einen Kopffaktor spricht für eine Beteiligung des ZNS an der Regulation. Als potentielle Kopffaktoren kämen einerseits JH in Betracht, das aber wahrscheinlich die Vitellogenin-Synthese nicht direkt steuert (s.u.), andererseits neuroendocrine Faktoren. Auch in der Hämolymphe kommt ein humoraler Faktor vor, dessen Aktivität durch Hitzebehandlung gehemmt werden kann und ebenso wie der Kopffaktor die Vitellogenin-Synthese spezifisch steigert. Es könnte daher sein, daß es sich bei Kopf- und Hämolymphfaktor um ein und denselben Faktor handelt. Die Hitzelabilität legt eine an der Wirkung beteiligte Peptidstruktur nahe.

Die direkte Beteiligung eines neuroendocrinen Faktors an der Regulation der Vitellogenin-Synthese, wie diese erste vorläufige experimentelle Evidenz suggeriert, ist bei Insekten bisher noch nicht gefunden worden. Im Allgemeinen würde man eher aufgrund der Studien an Vertebraten das klassische Konzept erwarten, nach dem Neurosekrete die Aktivität endocriner Organe steuern. Auch bei Insekten ist, bislang nur in wenigen Systemen, der Nachweis gelungen, daß neuroendocrine Faktoren die Aktivität endocriner Organe kontrollieren: bei den Corpora allata, den Prothoraxdrüsen und den Ovarien. So stimulieren und hemmen humorale Faktoren des Gehirns die Aktivität der Corpora allata bei Diploptera punctata (TOBE, 1980; TOBE et

al., 1981). Außerdem regt das PTTH die Prothoraxdrüse an, Ecdyson zu synthetisieren (BOLLENBACHER et al., 1975). Schließlich stimuliert das FCTH (follicle cell tropic hormone) die Follikelepithelzellen bei Locusta zur Ecdyson-Biosynthese (HOFFMANN et al., 1980) und produziert und sezerniert das Ovar bei Aedes auf den neurohormonalen Stimulus durch EDNH (LEA, 1972) Ecdyson (HAGEDORN et al., 1979). Ein direkter Einfluß von Neurosekreten auf die Proteinsynthese wurde bisher lediglich bei Stimulation der Proteinsynthese männlicher aczessorischer Drüsen durch ein aus dem Kopf isoliertes Polypeptid in vitro belegt (BARKER und DAVEY, 1983).

Wenn also bisher bei Insekten noch keine direkte Kontrolle der Vitellogenin-Synthese durch neuroendocrine Faktoren belegt ist, so lassen sich doch ältere Untersuchungen zur Neurosekretion bei Bienen mit Oogenese und Vitellogenin-Synthese zeitlich korrelieren. Der Sekretgehalt der Neurosekretorischen Zellen (NSZ) der Pars intercerebralis ist bei Königinnen vor dem Hochzeitsflug hoch, in den wenigen Tagen zwischen Hochzeitsflug und Eiablage nimmt er ab, während die Oocyten wachsen (BIEDERMANN, 1964). Er vermutete, daß zwischen Neurosekretion und Proteinsynthese in der Eibildung ein Zusammenhang besteht. Allerdings ist "Sekretgehalt" ein etwas fragwürdiger Parameter , weil hoher Sekretgehalt nicht unbedingt mit Synthese- und Sekretionsaktivität gleichgesetzt werden kann, sondern auch Sekretspeicherung und Ruhephase bedeuten könnte. Außerdem vergrößern die NSZ ihr Kernvolumen einerseits während der ersten 6 Lebenstage im Zusammenhang mit dem Hochzeitsflug und andererseits vor Beginn bzw. Wiederbeginn der Eiablage (HERRMANN, 1969). Auch die $CO_2$-Narkose aktiviert die NSZ - wenn man die Kernvolumenvergrößerung mit Aktivierung gleichsetzt - und führt zur starken Sekretausschüttung (HERRMANN, 1969). Der zeitliche Zusammenhang zwischen NSZ-Aktivität und Oogenese wie auch Vitellogenin-Synthese, die ja nach dem Hochzeitsflug sprunghaft ansteigt (Tab. 15; vgl. auch ENGELS, 1972; 1974), lassen auf dem Hintergrund der in vitro-Experimente eine direkte Synthesekontrolle naheliegend erscheinen.

Darüberhinaus könnte ähnliches auch für die Arbeiterinnen zutreffen, da das Kernvolumen der NSZ weiselloser Arbeiterinnen am 8. Lebenstag sehr niedrig ist und am 10. ein Maximum erreicht (GAST, 1967) - einen Tag, bevor die Oogenese bei weisellosen Arbeiterinnen einsetzt (VELTHUIS, 1976; COUTURIER, 1984).

Neben dem postulierten neuroendocrinen Faktor, der die Vitellogenin-Synthese spezifisch steigert, ist wahrscheinlich ein weiterer Faktor erforderlich, der die Proteinsynthese im Fettkörper stimuliert, denn eiergende und nichteierlegene Königinnen unterscheiden sich nicht nur im Tracereinbau in Vitellogenin, sondern auch in der Markierung der Gesamtproteine (Tab. 34, 39).

ECDYSTERON ALS REGULATIONSFAKTOR

Als weiterer humoraler Regulationsfaktor kommt Ecdysteron in Betracht. Es stimuliert bei Aedes (HAGEDORN et al., 1975), Sarcophaga (HUYBRECHTS, 1982), Calliphora (JENSEN et al., 1981) und Drosophila (JOWETT und POSTLETHWAIT, 1980) die Vitellogenin-Synthese. In den beschriebenen in vitro-Experimenten stimuliert Ecdysteron nicht allein die Vitellogenin-Synthese, sondern auch die Produktion von Hämolymphproteinen insgesamt. Eine derartige Wirkung von Ecdysteron ist in in vitro-Kultur auch bei anderen Insekten beobachtet worden (ONO et al., 1975, MARKS, 1980). Da Ecdyson in höheren Konzentrationen nur bei eierlegenden Königinnen auftritt, könnte seine Aufgabe darin liegen, in Zusammenhang mit der Oogenese generalisiert die Syntheseaktivität des Fettkörpers als Zentrum des intermediären Stoffwechsels (WYATT, 1975) zu steigern. Da Ecdysteron die Vitellogenin-Synthese nicht spezifisch steigert, muß ein weiterer Faktor angenommen werden, der diese Funktion übernimmt.

JUVENILHORMON ALS REGULATIONSFAKTOR

Es zeichnet sich ab, daß JH für die Regulation der Vitellogenin-Synthese keine Rolle spielt, denn diese wird weder in vitro stimuliert noch durch Allatektomie an frisch geschlüpften Königinnen unterbunden. Diese Annahme steht in Einklang mit den schon zuvor erwähnten Allatektomie-Experimenten an Königinnnen ( HRDY und SLAMA, 1963; VAN IAERE, 1974; ENGELS und RAMAMURTY, 1976; RAMAMURTHY und ENGELS, 1977; DAERR, 1978b), wenngleich die theoretische Möglichkeit, daß JH von einer anderen Quelle als von den CA stammt, nicht ausgeschlossen wurde. Auch schließen die bisherigen in vitro-Experimente eine JH-Beteiligung deshalb nicht aus, weil die Expositionsdauer der Organe im JH-haltigem Medium zu kurz gewesen sein könnte. Auch könnte es möglich sein, daß ein zusätzlicher Faktor, z.B. ein JH-Bindungsprotein, fehlte. Andererseits verändert JH-Applikation auch bei Drohnen weder Vitellogenin-Titer (TRENCZEK, 1984) noch Vitellogenin-Synthese (ZILLIKENS, 1984), wenngleich bei diesen Untersuchungen schlüs-

sige definitive Experimente z.B. durch Ausschaltung der Corpora allata fehlen; sie wären durchzuführen, ehe ein JH-Einfluß ausgeschlossen werden kann.

Lediglich bei Arbeiterinnen schien JH die Vitellogenin-Synthese zu steuern, denn niedrige applizierte JH-Dosen verursachten bei allatektomierten Arbeiterinnen einen Anstieg des Vitellogenin-Titers und hohe JH-Dosen führten erst einige Zeit später, nach postuliertem JH-Abbau, zu einem Anstieg des Vitellogenin-Titers (IMBODEN et al., 1976). Zudem sind niedrige JH-Titer in der Hämolymphe mit hohem Vitellogenin-Gehalt korreliert und hohe JH-Titer treten zusammen mit niedrigen Vitellogenin-Gehalten auf (RUTZ et al., 1976; FLURI et al., 1982). Schließlich weisen Winterbienen weisen einen noch niedrigeren JH-Gehalt und noch höheren Vitellogenin-Titer auf (FLURI et al., 1982). Mit einer direkten hormonellen Regulation lassen sich diese Daten jedoch nicht in Einklang bringen, da im positiven Fall ein dose-response-Verhältnis von Hormonkonzentration und Synthese nachzuweisen sein sollte, wie es bei denjenigen Insekten belegt ist und daher als eine Vorausetzung gefordert wird, bei denen die Vitellogenin-Synthese durch JH induziert und kontrolliert wird (ENGELMANN, 1971; CHEN et al.,1976). Außerdem spiegeln Proteintiter nicht per se ihre Syntheserate wider (vgl. I.5.).

Die Ergebnisse an Arbeiterinnen können auch dahingehend interpretiert werden, daß JH den Polyethismus und die Umstellung von Sommer- auf Winterbienen steuert (FLURI et al., 1982), wie es auch für Jungköniginnen von Hummeln zutrifft (RÖSELER, 1984), indem es generalisiert die Differenzierung des Fettkörpers in Hinblick auf sekretorische Funktion bzw. Bildung von Reservestoffen (Winterbienen) o.ä. als sich gegenseitig ausschließende Funktionsprogramme steuert, ohne die Vitellogenin-Synthese direkt zu beeinflussen. Wahrscheinlich bedeutet der Übergang von Stock- zu Flugbiene, der durch JH induziert werden kann (JAYCOX et al., 1974; RUTZ et al., 1975; JAYCOX, 1976; FLURI et al., 1982), daß die Syntheseaktivität des Fettkörpers generell eingeschränkt wird.

Bis das komplexe Regulationssystem der Vitellogenin-Synthese bei Bienen aufgeklärt ist, an dem wahrscheinlich JH für die Differenzierung des Fettkörpers, neuroendocrine Faktoren spezifisch die Vitellogenin-Synthese zentral steuern und ovarielle Faktoren und Ecdysteron die Syntheseaktivität modulieren, müssen zunächst weitere Untersuchungen vorgenommen wer-

den: Für alle angenommenen Regulationsfaktoren muß zunächst der Beleg einer Dosis-abhängigen Synthesestimulation erbracht werden. Anschließend würde ihre Isolierung und Charakterisierung erforderlich sein. Außerdem könnte eine Wechselwirkung von Ovar und Fettkörper durch Koinkubationen von Fettkörpern von verschiedenen Individuen der beiden weiblichen Kasten in Abhängigkeit von deren Eilageaktivität geprüft werden.

## V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde durch Untersuchungen zur Veränderung des Hämolymphproteinmusters und seiner Synthese, Hormontiterbestimmungen und Analysen der Vitellogenin-Synthese im Verlauf der Metamorphose der Bienenkönigin eine Basis von Daten geschaffen, die erlaubte, die hormonelle Kontrolle der Initiation der Vitellogenin-Synthese gezielt zu prüfen. Ferner wurde ein System zur in vitro-Kultur von Organen der Honigbiene entwickelt, das Studien zur Regulation der Vitellogenin-Synthese ermöglichte.

Zunächst wurde die Königinnen-Entwicklung verfolgt und in der Puppenphase 15 verschiedene Entwicklungsstadien charakterisiert. Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, um detailierte Entwicklungsstudien zu betreiben, weil bis auf wenige Stunden genaue Bestimmungen des Entwicklungsalters individueller Königinnen möglich sind. Daraufhin wurden der Ecdysteroid- und der Juvenilhormon-Titer der Hämolymphe von Königinnenpuppen bestimmt. Sie entsprechen dem bei Holometabolen zu erwartenden Bild: Früh in der Puppenphase erscheint ein Ecdysteroid-Peak ($1{,}4 \times 10^{-6}$M). Dannach sinkt der Titer bis zur Imaginalhäutung ($2 \times 10^{-8}$M) allmählich ab. Der JH-Titer sinkt schon vor der Puppenhäutung. Während der Puppenentwicklung bleibt er niedrig bzw. nicht nachweisbar ( 400 GU/ml), in der Mitte der Puppenentwicklung treten zwei kleine Aktivitätspeaks auf und ca. 15 h vor der Imaginalhäutung steigt der JH-Titer zuerst allmählich dann rapide an und erreicht dann innerhalb eines Tages Titer von über 5000 GU/ml. Der Verlauf des JH-Titers korrespondiert mit der zusätzlich untersuchten JH-Biosyntheseaktivität der Corpora allata in vitro und dem Corpora allata-Volumen.

Daraufhin wurde das Vitellogenin charakterisiert. Vitellogenin ist unter denaturierenden Bedingungen (SDS) ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 183 K. Es wird vom Fettkörper synthetisiert, wie in vitro-Inkubationen belegen, und von den Oocyten selektiv aufgenommen. Ein hergestelltes Vitellogenin-spezifisches Antiserum bindet dieses Polypeptid in der Hämolymphe von Königinnen, im Ovar, in Homogenat und Medium in vitro inkubierter Fettkörper. Im Homogenat des Fettkörpers wird ein zweites Polypeptid von 179 K gebunden, das wahrscheinlich den intrazellulären, präsekretorischen Vorläufer von Vitellogenin darstellt. Außerdem wird im Homogenat in vitro inkubierter Ovarien eierlegender Königinnen markiertes Vitellogenin vom

Antikörper gebunden. Dies kann als Indiz für die Synthesekompetenz des Ovars für Vitellogenin angesehen werden. Trotzdem ist der Fettkörper Hauptsyntheseort für Dotterproteine, da die radioaktive Markierung von Vitellogenin im Ovar relativ niedrig ist.

Das Muster der Hämolymphproteine und ihrer Synthese während der Metamorphose der Bienenkönigin offenbart spezifisch larvale, spezifisch imaginale und solche Polypeptide, die in beiden Entwicklungsstadien vorkommen. Die Synthese aller Hämolymph-Proteine nimmt während der Puppenentwicklung ab und wird etwa 26 h vor der Imaginalhäutung fast vollkommen eingestellt. Später, 10,5 h vor der Imaginalhäutung, beginnt die Neusynthese von Hämolymphproteinen, vor allem die Bildung des typisch imaginalen Vitellogenins.

Dekapitations- und Allatektomie-Experimente an Königinnen-Puppen verschiedener Entwicklungsstadien verhindern die Vitellogenin-Synthese nicht. D.h. Vitellogenin wird unabhängig von Juvenilhormon und Faktoren des Kopfes de novo synthetisiert. Juvenilhormon, vor dem dem Zeitpunkt seines physiologischen Auftretens appliziert, steigert andererseits die Vitellogenin-Synthese - aber nur dann, wenn als Präparationszeitpunkt der Zeitpunkt des ersten Auftretens von Vitellogenin-Synthese in der Normogenese gewählt wird. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird die Hypothese einer endogen gesteuerten Protodifferenzierung und einer JH-abhängigen Differenzierung des imaginalen Fettkörpers aufgestellt und diskutiert.

Um die Regulation der Vitellogenin-Synthese näher untersuchen zu können, wurde ferner ein in vitro-System für die Kultur von Honigbienen-Organen entwickelt, das optimale Proteinsyntheseraten explantierter Fettkörper und Ovarien erlaubt. Das neuentwickelte Kulturmedium wurde der Zusammensetzung der Honigbienen-Hämolymphe nachempfunden und ermöglicht bis zu dreifach höhere Tracer-Inkorporation als andere getestete Medien. Wenn die Organe zusammen mit ihrem Tracheensystem inkubiert werden, das zur Umgebungsluft offen ist, ist die Proteinsynthese 17-(Fettkörper) bzw. 15-fach (Ovar) höher als bei Präparationen ohne Tracheen. In vitro inkubierte Fettkörper zeigen während der ersten 10 h in Kultur stark variierende Syntheseraten, die als Wundreaktion interpretiert werden können, weil neue Proteine im Medium auftauchen und die Polyphenoloxidase aktiviert wird. Danach bleibt die Proteinsyntheserate der Fettkörper für die nächsten 60 h konstant. Ovarien eierlegender Königinnen zeigen in vitro keine

Wundreaktion und synthetisieren Proteine mit konstanter Rate für mindestens 20 h.

Der Fettkörper verhält sich gemessen an Muster und Markierung seiner Proteinsyntheseprodukte qualitiativ in vivo und in vitro gleich. So gleichen sich die relativen Vitellogeninsyntheseraten imaginaler Königinnen: Die Tracer-Inkorpration in Vitellogenin steigt in beiden Systemen von frisch gehäuteten Königinnen zu Jungköniginnen nach dem Schlupf um das 2,1-fache und zu eierlegenden Königinnen um das 7,2-fache. Außerdem hängt die Vitelgeninsynthese in vivo wie in vitro von der Eilageaktivität der Königin ab.

Humorale Faktoren steigern die Vitellogenin-Synthese von Fettkörper-Präparationen in vitro: Kopfextrakte eierlegender Königinnen und Hämolymphe eierlegender Königinnen, nur 1 min hitzeinaktiviert und dem Medium 10%ig zugesetzt, steigern sie spezifisch. Dagegen stimuliert $3 \times 10^{-8}$M Ecdysteron neben der Vitellogenin-Synthese die Synthese ins Medium sezernierter Proteine insgesamt. Juvenilhormon und 10 min lang hitzebehandelte Hämolymphe eierlegender Königinnen haben keinen Einfluß auf die Proteinsynthese des Fettkörpers in vitro. Es wird angenommen, daß neuroendocrine Faktoren die Vitellogenin-Synthese direkt kontrollieren. Aus den Ergebnissen wird ein Modell der Regulation der Vitellogenin-Synthese bei Königinnen abgeleitet und diskutiert.

VI. Literatur

Abu-Hakima, R. and Davey, K.G. (1975)
Two actions of juvenile hormone on the follicle cells of Rhodnius prolixus.
Can. J. Zool. 53, 1187-1188.

Abu-Hakima, R. and Davey, K.G. (1977)
The action of juvenile hormone on the follicle cells of Rhodnius prolixus: The importance of volume changes.
J. Exp. Biol. 69, 33-44.

Adams, T.S. (1970)
Ovarian regulation of the corpus allatum in the housefly, Musca domestica.
J. Insect Physiol. 16, 349-360.

Adams, T.S. (1976)
Ovaries, ring gland, and neurosecretion during second gonotrophic cycle in the housefly, Musca domestica.
Gen. Comp. Endocrinol. 30, 69-76.

Adams, T.S. (1980)
The role of ovarian hormones in maintaining cyclical egg production in insects.
In: Clark, W.H. Jr and Adams, T.S.(eds.):
Adv. Invertebrate Reprod. Vol. II, 109-125.

Alumot, E.; Lensky,Y. and Holstein, P. (1969)
Sugars and trehalase in the reproductive organs and hemolymph of the queen and drone honeybees.
Comp. Biochem. Physiol. 28, 1419-1425.

Baehr, J.C.; Porcheron, P. and Dray, F. (1978)
Dosages radioimmunologiques des ecdysteroides et des hormones juveniles au cours des deux derniers stades larvaires de Rhodnius prolixus.
C.R. Acad. Sci. (Paris), Ser. D 287, 523-526.

Barker, J.F. and Davey, K.G. (1983)
A polypeptide from the brain and corpus cardiacum of male Rhodnius prolixus which stimulates in vitro protein synthesis in the transparent accessory reproductive gland.
Insect Biochem. 13, 7-10.

Bar-Zev, A.; Wajc, E.; Cohen, E.; Sapir, L.; Applebaum, S.W. and Emmerich, H. (1975)
Vitellogenin accumulation in the fat body and haemolymph of Locusta migratoria in relation to egg maturation.
J. Insect Physiol. 21, 1257-1263.

Bell, W.J. (1969a)
Continuous and rhythmic reproductive cycles observed in Periplaneta americana.
Biol. Bull. 137, 239-249.

Bell, W.J. (1969b)
Dual role of juvenile hormone in the control of yolk formation in Periplaneta americana.
J. Insect Physiol. 15, 1279-1290.

Bell, W.J. (1970)
Demonstration and characterization of two vitellogenic blood proteins in Periplaneta americana: An immunological analysis.
J. Insect Physiol. 16, 291-299.

Bell, W.J. (1972)
Transplantation of ovaries into male Periplaneta americana: Effects on vitellogenesis and vitellogenin secretion.
J. Insect Physiol. 18, 851-855.

Bell, W.J. (1973)
Factors controlling initiation of vitellogenesis in an primitively social bee, Lasioglossum zephyrum (Hymenoptera: Halictidae).
Insectes sociaux 20, 253-260.

Bell, W.J. and Barth, R.H. (1971)
Initiation of yolk deposition by juvenile hormone.
Nature New Biol. 230, 220-221.

Bergot, B.J.; Ratcliff, M. and Schooley, D.A. (1981)
A method for quantitative determination of the four known JHs in insect tissue using GC/MS.
J. Chromatogr. 204, 231-244.

Bergot, B.J.; Schooley, D.A. and de Kort, C.A.D. (1981b)
Identification of JH III as the principal juvenile hormone in Locusta migratoria.
Experimentia 37, 209-210.

Bergink, E.W. et al. (1974)
Estrogen-induced synthesis of yolk proteins in roosters.
Amer. Zool. 14, 1177-1193.

Bertholf, L.M. (1925)
The moults of the honeybee.
J. econ. Ent. 18, 380-384.

Biedermann, M. (1964)
Neurosekretion bei Arbeiterinnen und Königinnen von Apis mellifica L. unter natürlichen und experimentellen Bedingungen.
Z. wiss. Zool. 170, 255-308.

Bishop, G.H. (1958)
Nuclear and cytoplasmatic changes in fat body cells of the queen bee during metamorphosis.
J. Exp. Zool. 137, 501-525.

Blomquist, G.J.; Chu, A.J. and Remaley, S. (1980)
Biosynthesis of wax in the honeybee Apis mellifera.
Insect Biochem. 10, 313-321.

Bohm, M.K.; Behan, M. and Hagedorn, H.H. (1978)
Termination of vitellogenin synthesis by mosquito fat body, a programmed response to ecdysterone.
Physiol. Entomol. 3, 17-25.

Bollenbacher, W.E.; Vedeckis, W.V.; Gilbert, L.I. and O'Connor, J.D. (1975)
Ecdysone titers and prothoracic gland acticity during the larval-pupal development of Manduca sexta.
Dev. Biol. 44, 46-53.

Bollenbacher, W.E.; Zvenko, H.; Kumaran, A.K. and Gilbert, L.I. (1978)
Changes in ecdysone content during postembryonic development of the wax moth, Galleria mellonella: The role of the ovary.
Gen. Comp. Endocrinol. 34, 169-179.

Boman, H.G. and Steiner, H. (1981)
Humoral immunity in cecropia pupae.
In: Henle et al. (Eds.): Current Topics in Microbiology and Immunology 94/95: 75-92.

Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974)
A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels.
Eur. J. Biochem. 46, 83-88.

Borst, D.W. and O'Connor, J.D. (1972)
Arthropod moulting hormone: Radioimmunoassay.
Science 178, 418-419.

Borst, D.W. and O'Connor, J.D. (1974)
Trace analysis of ecdysones by gas-liquid chromatography, radioimmunoassay and bioassay.
Steroids, 24, 637-655.

Bounias, M. (1978)
Intra-glycemic relations occurring during the development of honey bee workers.
Comp. Biochem. Physiol. 61 A, 13-18.

Bowers, W.S.; Ohta, T.; Cleere, J.S. and Marsella, P.A. (1976)
Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants.
Science 193, 542-547.

Bownes, M. (1982)
Hormonal and genetic regulation of vitellogenesis in Drosophila.
Quart. Rev. Biol. 57, 247-274.

Bradford, M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254.

Braun, R. (1985)
Titel noch nicht bekannt.
Diplomarbeit, Tübingen.

Brennan, M.D.; Weiner, A.J.; Goralski, T.J. and Mahowald, A.P. (1982)
The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in Drosophila melanogaster.
Dev. Biol. 89, 225-236.

Briers, T. and de Loof, A. (1980)
The moulting hormone activity in Sarcophaga bullata in relation to metamorphosis and reproduction.
Int. J. Invertebrate Reprod. 2, 363-372.

Britten, R.J. and McClure, F.T. (1962)
The amino acid pool in Escherichia coli.
Bacteriol. Rev. 26, 292-335.

Brodsky, W.Y. and Uryvaeva, I.V. (1977)
Cell polyploidy: Its relation to tissue growth and function.
Int. Rev. Cytol. 50, 275-332.

Brookes, V.J. (1969)
The induction of yolk protein synthesis in the fat body of an insect Leucophaea maderae by an analog of juvenile hormone.
Bev. Biol. 20, 459-471.

Brooks, M.A. and Kurtti T.J. (1971)
Insect cell and tissue culture.
Ann. Rev. Entomol. 16, 27-52.

Bühler, A.; Lanzrein, B. and Wille, H. (1983)
Influence of temperature and carbon dioxide concentration on juvenile hormone titre and dependent parameters of adult worker honey bees.
J. Insect Physiol. 29, 885-893.

Butler, C.G. and Fairly, E.M. (1963)
The role of the queen in preventing oogenesis in worker honeybees.
J. Apic. Res. 2, 14-18.

Carriere, R. (1969)
The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation.
Int. Rev. Cytol. 25, 201-277.

Chen, T.T.; Couble, P.; DeLucca, F.L. and Wyatt, G.R. (1976)
Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in Locusta migratoria.
In: Gilbert, L.I. (ed.): The Juvenile Hormones.
Plenum Press, New York, 505-529.

Cherbas, L. (1973)
The induction of an injury reaction in cultured haemocytes from saturniid pupae.
J. Insect Physiol. 19, 2o11-2o23.

Chinzei, Y.; Chino, H. and Wyatt, G.R. (1982)
Vitellogenin mRNA in locust fat body: identification, isolation and qualitative changes induced by juvenile hormone.
Can. J. Biochem. 60, 243-251.

Chinzei, Y. and Tojo, S. (1972)
Nucleic acid changes in the whole body and several organs of the silkworm, Bombyx mori, during metamorphosis.
J. Insect Physiol. 18, 1683-1698.

Clements, A.N. (1963)
The physiology of mosquitoes.
Pergamon Press, New York, 393pp.

Couturier, M. (1984)
Sozialverhalten, Ovarstatus und Vitellogenintiter bei Arbeiterinnen in weisellosen Bienenvölkern.
Staatsexamensarbeit, Tübingen.

Czarnowski, C. von (1954)
Zur papierchromatographischen Blutzuckerbestimmung bei der Honigbiene.
Naturwissenschaften 41, 557.

Czoppelt, C. und Rembold, H. (1970)
Vergleichende Analyse des Kohlenhydratstoffwechsels bei den Kasten der Honigbiene, Apis mellifera.
J. Insect Physiol. 16, 1249-1264.

Daerr, E. (1978a)
Effekte einer Allatektomie frisch geschlüpfter Bienenköniginnen auf Hochzeitsflug und Eiablage.
Staatsexamensarbeit, Tübingen.

Daerr, E. (1978b)
Effekte einer Allatektomie frisch geschlüpfter Bienenköniginnen auf Hochzeitsflug und Eiablage.
Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 1, 317-319.

Davey, K.G. and Kuster, J.E. (1981)
The source of an antigonadotropin in the female of Rhodnius prolixus Stal.
Can. J. Zool. 59, 761-764.

Delachambre, J.; Bresson, M.T.; Connat, J.-L. and Delbecque, J.-P. (1980)
Ecdysteroid titres and integumental events during the metamorphosis of Tenebrio molitor.
In: Hoffmann, J. (Ed.): Progress in ecdysone research. Elsevier, Amsterdam, 211-234.

Delbecque, J.-P.; Hirn, M.; Delachambre, J. and Reggi, M. de (1978)
Cuticular cycle and molting hormone levels during metamorphosis of Tenebrio molitor.
Dev. Biol. 64, 11-30.

Delbecque, J.-P. and Slama, K. (1980)
Ecdysteroid titres during autonomous metamorphosis in a dermestid beetle.
Z. Naturforsch. 35 c, 1066-1080.

Deleurance, S.; Baehr, J.C.; Porcheron, P. and Cassier, P. (1980)
Diapause et evolution des taux des ecdysteroides et des hormones juveniles chez les nymphes et les imagos de Leptinotarsa decemlineata.
C. R. Acad. Sci. (Paris) Ser D 290, 367-370.

Della-Cioppa, G. and Engelmann, F. (1984)
Juvenile hormone regulation of phospholipid synthesis in the endoplasmatic reticulum of vitellogenic fat body cells from Leucophaea maderae.
Insect Biochem. 14, 27-36.

Dhadialla, T.S. and Wyatt, G.R. (1983)
Juvenile hormone-dependent vitellogenin synthesis in Locusta migratoria fat body: Inducibility related to sex and stage.
Dev. Biol. 96, 436-444.

Dittmann, F.; Hagedorn, H.H. and Kirchmair, M. (1985)
Ploidy levels in fat body of the mosquito Aedes aegypti.
(im Druck).

Douarin, N. le (1971)
Organ culture methods.
In: Vago, C. (Ed.): Invertebrate tissue culture. Vol. 1.
Academic Press, New York, 41-82.

Dreischer, H. (1956)
Untersuchungen über die Arbeitstätigkeit und Drüsenentwicklung altersbestimmter Bienen im weisellosen Volk.
Zool. Jb. Physiol. 66, 429-472.

Engelmann, F. (1971)
Juvenile hormone controlled synthesis of female specific protein in the cockroach Leucophaea maderae.
Arch. Biochem. Biophys. 145, 439-447.

Engelmann, F. (1979)
Insect vitellogenin:
Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis.
Adv. Insect Physiol. 14, 49-1o8.

Engelmann, F. (1980)
Endocrine control of vitellogenin synthesis.
In: Locke, M. and Smith. D.S. (Eds.): Insect biology in the future.
Academic Press, New York, 311-324.

Engelmann, F. and Friedel, T. (1974)
Insect yolk protein precursor, a juvenile hormone induced phosphoprotein.
Life Sci. 14, 587-594.

Engelmann, F.; Hill, L. and Wilkens, J.L. (1971)
Juvenile hormone control of female specific protein synthesis in Leucophaea maderae, Schistocerca vaga and Sarcophaga bullata.
J. Insect Physiol. 17, 2179-2191.

Engels, W. (1972)
Quantitative Untersuchungen zum Dotterprotein-Haushalt der Honigbiene.
W. Roux' Archiv 171, 55-86.

Engels, W. (1974)
Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social hymenoptera.
Amer. Zool. 14, 1229-1237.

Engels, W. (1978)
Der Einfluß verschiedener Juvenilhormone und Dosierungen auf den Vitellogenin-Stoffwechsel eierlegender Bienenköniginnen.
Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 1, 308-312.

Engels, W. (1981)
Control of fertility in bees.
In: Sehnal,F.; Zabza, A.; Menn, J.J. and Cymborowski, B. (eds.): Regulation of insect development and behavior. Vol 2.
Wroclaw Technical University Press, Wroclaw; 655-680.

Engels, W. und Engels, E. (1977)
Vitellogenin und Fertilität bei stachellosen Bienen.
Insectes sociaux 24, 71-94.

Engels, W. und Fahrenhorst, H. (1974)
Alters- und kastenspezifische Veränderungen der Haemolymph-Protein-Spektren bei Apis mellifica.
W. Roux' Archiv 174, 285-296.

Engels, W.; Goncalves, L.S. and Engels, E. (1976)
Effects of carbon dioxide on vitellogenin metabolism in unmated queen honeybees.
J. Apic. Res. 15, 3-10.

Engels, W. and Ramamurty, P.S. (1976)
Initiation of oögenesis in allatectomized virgin honey bee queens by carbon dioxide treatment.
J. Insect Physiol. 22, 1427-1432.

Fahrenhorst, H. (1973)
Alters-, Kasten- und Genotyp- bedingte Unterschiede im Protein-Spektrum der Haemolymphe bei APIS MELLIFICA unter besonderer Berücksichtigung des Dotterproteins.
Staatsexamensarbeit, Münster

Fain, M.J. and Riddiford, L.M. (1975)
Juvenile hormone titres in the haemolymph during late larval development of the tobacco hornworm, Manduca sexta.
Biol Bull. 149, 506-521.

Fallon, A.M.; Hagedorn, H.H.; Wyatt, G.R. and Laufer, H. (1974)
Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito Aedes aegypti by ecdysone.
J. Insect Physiol. 20, 1815-1823.

Faye, I.; Pye, A.; Rasmuson, T.; Boman, H.G. and Boman, I.A. (1975)
Insect immunity. II.
Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of Hyalophora cecropia and Samia cynthia.
Infect. Immunol. 12, 1426-1438.

Faye, I. and Wyatt, G.R. (1980)
The synthesis of antibacterial proteins in isolated fatbody from Cecropia silk moth pupae.
Experientia 36, 1325-1326.

Feyereisen, R.; Johnson, G.; Koener, J.; Stay, B. and Tobe, S.S. (1981)
Precocenes as proallatocidins in adult female Diploptera punctata: a functional and ultrastructural study.
J. Insect Physiol. 27, 855-868.

Fish, D.C.; Dobbs, J.P. and Elliot, J.M. (1973)
Effect of osmotic pressure, $Na^+/K^+$-ratio and medium concentration on the enzyme activity and growth of L cells in suspension culture.
In Vitro 9, 108-113.

Flanagan, T.R. and Hagedorn, H.H. (1977)
Vitellogenin synthesis in the mosquito: the role of juvenile hormone in the development of reponsiveness to ecdysone.
Physiol. Entomol. 2, 173-178.

Florkin, M. and Jeuniaux, C. (1963)
Cationic pattern of hemolymph in adult hymenoptera.
Life Sci. 12, 982-985.

Florkin, M. and Jeuniaux, C. (1974)
Hemolymph: Composition.
in: Rockstein, M. (ed.): Physiology of insecta, Vol 5. Academic Press, New York, 255-307.

Fluri, P. (1983)
Precocene II has no anti-juvenile hormone effects in adult honeybees.
Experientia 39, 919-920.

Fluri, P.; Lüscher, M.; Wille, H. and Gerig, L. (1982)
Changes in weight of the pharyngeal gland and hemolymph titers of juvenile hormone , protein and vitellogenin in worker honey bees.
J. Insect Physiol. 28, 61-68.

Fluri, P.; Sabatini, A.G.; Vecchi, M.A. and Wille, H. (1981)
Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titers in laying queen honeybees.
J. Apic. Res. 2o, 221-225.

Fluri, P.; Wille, H.; Gerig, L. and Lüscher, M. (1977)
Juvenile hormone, vitellogenin and haemocyte composition in winter worker honeybees (Apis mellifera).
Experientia 33, 1240-1241.

Fragouli-Fournogeraki, M.E.; Fragoulis, E.G. and Sekeris, C.E. (1978)
Protein synthesis by polysomes from the epidermis of blowfly larvae: dependence of formation of dopa-decarboxylase on developmental stage.
Insect Biochem. 8, 435-441.

Gast, R. (1967)
Untersuchungen über den Einfluß der Königinnensubstanz auf die Entwicklung der endokrinen Drüsen bei Arbeiterinnen.
Insectes sociaux 14, 1-12.

Gellissen, G. and Emmerich, H. (1978)
Changes in the titer of vitellogenin and of diglyceride carrier lipoprotein in the blood of adult Locusta migratoria: comparison with vitellogenin.
Can. J. Biochem. 59, 648-654.

Giauffret, A. (1971)
Cell culture of hymenotera.
In: Vago, C. (ed.): Intervertebrate tissue culture, Vol 1.
Academic Press, New York, 295-305.

Giese, Ch.; Spindler, K.D. and Emmerich, H. (1977)
The solubility of insect juvenile hormone in aqueous solutions and its adsorption by glassware and plastics.
Z. Naturforsch. 32c, 158-160.

Gilbert, L.I.; Bollenbacher, W.E. and Granger, N.A. (1980)
Regulation of endocrine glands, hormone titer and hormone metabolism.
Ann. Rev. Physiol. 42, 493-510.

Grace, T.D.C. (1962)
Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro.
Nature 195, 788-789.

Granger, N.A.; Niemiec, S.M.; Gilbert, L.I. and Bollenbacher, W.E. (1982)
Juvenile hormone synthesis in vitro by larval and pupal corpora allata of Manduca sexta.
Mol. Cell. Endocrinol. 28, 587-604 (1982)

Grobov, O.F.; Ziuman, B.V. and Kerimbaev, A.K. (1971)
Tissue culture in studying causative agents of honeybee diseases.
Int. Fed. Beekeep. Assoc. XXIII. Int. Apic. Congr. Moscow, Apimondia, 448-491.

Grundler, O.J. (1975)
Electron microscopic studies on the retina of the honey bee Apis mellifera. Part 2. Investigation on reaction of the fine structure of the rhabdomic tubules after exposure to various experimental influences especially to light of different wavelengths.
Microsc. Acta 77, 241-258.

Gupta, A.P. (1984)
Hemocytic and humoral immunity in arthropods.
XVII. Int. Congr. Entomol., Hamburg, 758.

Gwadz, R.W. and Spielman, A. (1973)
Corpus allatum control of ovarian development in mosquitoes.
J. Insect Physiol. 19, 1441-1448.

Hagedorn, H.H. (1974)
The control of vitellogenesis in the mosquito Aedes aegypti.
Amer. Zool. 14, 1207-1217.

Hagedorn, H.H. (1984)
In: Gilbert, L.I. and Kerkut, G.A. (Eds.): Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharamacology. Pergamon Press, Oxford, Vol. 8, Chapt. 7.

Hagedorn, H.H. and Judson, C.L. (1972)
Purification and site of synthesis of Aedes aegypti yolk protein.
J. Exp. Zool. 182, 367-378.

Hagedorn, H.H.; O'Connor, J.D.; Fuchs, M.S.; Sage, B.; Schlaeger, D.A. and Bohm, M.K. (1975)
The ovary as a source of $\alpha$-ecdyson in an adult mosquito.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3255-3259.

Hagedorn, H.H. and Kunkel, J.G. (1979)
Vitellogenin and Vitellin in insects.
Ann. Rev. Entomol. 24, 475-5o5.

Hagedorn, H.H.; Shapiro, J.P. and K. Hanaoka (1979)
Ovarian ecdyson secretions is controlled by a brain hormone in an adult mosquito.
Nature 282, 92-94.

Hagedorn, H.H.; Turner, S.; Hagedorn, E.A.; Ponecorvo, D.; Greenbaum, P.; Pfeiffer, D.; Wheelock, G. and Flanagan, T.R. (1977)
Postemergence growth of the ovarian follicles of Aedes aegypti.
J. Insect Physiol. 23, 203-206.

Hagenguth, H. and Rembold, H. (1978)
Identification of juvenile hormone III as the only JH homolog in all developmental stages of the honey bee.
Z. Naturforsch. 33c, 847-850.

Hagmeister, A. (1973)
Immunologische Untersuchungen über extraoocytäres Vorkommen und interspezifische Unterschiede von Dotterproteinen in der Gattung Apis.
Staatsexamensarbeit, Münster.

Hagmeister, A. (1976)
Immunologische Untersuchungen an Hämolymph- und Eiproteinen von Honigbienen unter besonderer Berücksichtigung der Dotterproteine und interspezifische Vergleiche.
Inaugural-Dissertation, Münster.

Hanaoka, K. and Hagedorn, H.H. (1980)
Brain-hormone control of ecdyson by the ovary in a mosquito.
In: J.A. Hoffmann (ed.): Progress in ecdysone research.
Elsevier, Amsterdam, 467-480.

Handler, A.M. (1982)
Ecdysteroid titers during pupal and adult development in Drosophila melanogaster.
Dev. Biol. 93, 73-82.

Handler, A.M. and Postlethwait, J.H. (1978)
Regulation of vitellogenin synthesis in Drosophila by ecdysterone and juvenile hormone.
J. Exp. Zool. 202, 339-402.

Harding, C.R. and Scott, I.R. (1983)
Fluorography-limitations on its use for the quantitative detection of $^{3}H$- and $^{14}C$-labelled proteins in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 129, 371-376.

Harnish, D.G. and White, B.N. (1982a)
Insect vitellins identification purification and characterization from eight orders.
J. exp. Zool. 22o, 1-10.

Harnish, D.G. and White, B.N. (1982b)
An evolutionary model for the insect vitellins.
J. Mol. Evol. 18, 405-413.

Harnish, D.G.; Wyatt, G.R. and White, B.N. (1982)
Insect vitellins: Identification of primary products of translation.
J. Exp. Zool. 220, 11-19.

Hedrick, J.L. and Smith, A.J. (1968)
Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164.

Herrmann, H. (1969)
Die neurohormonale Kontrolle der Paarungsflüge und der Eilagetätigkeit bei der Bienenkönigin.
Z. Bienenforsch. 9, 509-544.

Himmer, A. (1927)
Der soziale Wärmehaushalt der Honigbiene.
II. Die Wärme der Bienenbrut.
Erlanger Jb. Bienenkunde 5, 1-32.

Hink, W.F. (1972)
Insect tissue culture.
Adv. Appl. Microbiol. 15, 157-214.

Hink, W.F. (1976)
In: Maramorosch, K.(ed.): Invertebrate tissue culture.
Academic Press, New York, 319-369.

Hink, W.F. (1980)
The 1979 compilation of invertebrate cell lines and culture media.
In: Kurstak/Maramorosch/Dübendörfer (Eds.): Invertebrate systems in vitro. Elsevier, Amsterdam, 573-578.

Hinton, H.E. (1973)
Neglected phases in metamorphosis: a reply to V.B. Wigglesworth.
J. Entoml. (A) 48, 57-68.

Hirn, M.H. and Delaage, M.A. (1980)
Radioimmunological approaches to the quantification of ecdysteroids.
In: Hoffmann. J. (Ed.): Progress in ecdysone research. Elsevier, Amsterdam, 69-82.

Hodgetts, R.B.; Sage, B. and O'Connor, J.D. (1977)
Ecdysone titers during postembryonic development of Drosophila melanogaster.
Dev. Biol. 6o, 31o-317.

Hoffmann, J.A.; Lagueux, M.; Hetru, C.; Charlet, M. and Goltzene, F. (1980)
Ecdysone in reproductively competent female adults and in embryos of insects.
In: Hoffmann, J.A. (Ed.): Progress in ecdysone research. Elsevier, Amsterdam, 431-465.

Honk, C.G.J. van; Velthius, H.H.W.; Röseler, P.-F. and Malataux, M.E. (1980)
The mandibular glands of Bombus terrestris queens as a source of queen pheromones.
Ent. exp. appl. 28, 191-198.

Horn. D.H.S.; Wilkie, J.S.; Sage, B.A. and O'Connor, J.D. (1976)
A high affinity antiserum specific for the ecdysone nucleus.
J. Insect Physiol. 22, 901-905.

Hoskins, W.M. and Harrison, H.S. (1934)
The buffering power of the contents of the ventriculus of the honey bee and its effect upon the toxicity of arsenic action.
J. Econ. Entomol. 27, 924-942.

Hovemann, B. and Galler, R. (1982)
Vitellogenin in Drosophila melanogaster: a comparisom of the YP I and YP II genes and their transcription products.
Nucl. Acids Res. 10, 2261-2274.

Hovemann, B.; Galler, R.; Walldorf, Y.; Kupper, H. and Bautz, E.K. (1981)
Vitellogenin in Drosophila melanogaster sequence of the yolk protein I gene and its flanking regions.
Nucl. Acids Res. 9, 4721-4734.

Hrdy, I. und Slama, K. (1963)
Einfluß der Allatektomie auf die Eiablage der Königin.
XIX. Int. Apimondia Congr., Prag, 203-205.

Hsiao, T.H.; Hsiao, C. and de Wilde, J. (1976)
Molting hormone titer changes and their significance during development of the colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata.
J. Insect Physiol. 22, 1257-1261.

Hung, M.C. and Wensink, P.C. (1981)
The sequence of the Drosophila melanogaster gene for yolk protein I.
Nucl. Acids Res. 9, 6407-6419.

Hung, M.C. and Wensink, P.C. (1983)
Sequence and structure conservation in yolk proteins and their genes.
J. Mol. Biol. 164, 481-492.

Huybrechts, R. (1982)
Hormonal regulatie van de vitellogeninesynthese by anautogene Calliphoridae.
Ph.D.Thesis, Catholic Univ. Leuven, Belgium.

Hwang-Hsu, K.; Reddy, G.; Kumaran, A.K.; Bollenbacher, W.E. and Gilbert, L.I. (1979)
Correlations between juvenile hormone esterase activity, ecdysone titre and cellular reprogramming in Galleria mellonella.
J. Insect Physiol. 25, 105-111.

Imboden, H.; Lanzrein, B.; Delbecque, J.P. and Lüscher, M. (1978)
Ecdysteroids and juvenile hormone during embryogenesis in the ovoviviparous cockroach Nauphoeta cinerea.
Gen. Comp. Endocrinol. 36, 628-635.

Imboden, H. und Lüscher, M. (1975)
Allatektomie bei adulten Bienenarbeiterinnen.
Rev. Suisse Zool. 82, 694-699.

Imboden, H.; Wille, H.; Gerig. L. and Lüscher, M. (1976)
Die Vitellogeninsynthese bei der Bienen-Arbeiterin (Apis mellifera) und ihre Abhängigkeit von Juvenilhormon.
Rev. Suisse Zool. 83, 928-933.

Irvine, D.J. and Brasch, K. (1981)
The influence of juvenile hormone on polyploidy and vitellogenesis in the fat body of Locusta migratoria.
Gen. Comp. Endocrinol. 45, 91-99.

James, T.C.; Bond, U.M.; Maack, C.A.; Applebaum, S.W. and Tata, J.R. (1983)
Evolutionary conversation of vitellogenin genes.
DNA 1, 345-353.

Jay, S.C. (1962)
Prepupal and pupal ecdysis of the honeybee.
J. Apic. res. 1, 14-18.

Jay, S.C. (1962b)
Colour changes of honeybee pupae.
Bee World 43, 119-122.

Jay, S.C. (1963)
The development of honeybees in their cells.
J. Apic. Res. 2, 117-134.

Jaycox, E.R. (1976)
Behavioral changes in worker honey bees (Apis mellifera L.) after injection with juvenile hormone (Hymenoptera: Apidae).
J. Kansas Entomol. Soc. 49, 165-170.

Jaycox, E.R.; Skowronek, W. and Godfrey, G. (1974)
Behavioral changes in worker honey bees induced by injections of an juvenile hormone mimic.
Ann. Ent. Soc. Amer. 67, 529-534.

Jensen, P.V.; Hansen, B.L.; Hansen. G.N. and Thompsen, E. (1981)
Vitellogenin and vitellin from the blowfly Calliphora vicina: occurrence, purification and antigenic characterization.
Insect Biochem. 11, 129-136.

Jowett, T. and Postlethwait, J.H. (1980)
The regulation of yolk polypeptde synthesis in Drosphila ovaries and fat body by 2o-hydroxy-ecdysone and juvenile hormone analogue.
Dev. Biol. 80, 225-234.

Kaatz, H.H. (1980)
Untersuchungen zur Initiation der Vitellogenin-Synthese bei der Bienenkönigin.
Diplomarbeit, Tübingen.

Kaiser, P.(1949)
Histologische Untersuchungen über die Corpora allata und Prothoraxdrüse der Lepidopteren in Bezug auf ihre Funktion.
Roux' Arch. 144.

Kambysellis, M.P. (1977)
Genetic and hormonal regulation of vitellogenesis in DROSOPHILA.
Amer. Zool. 17, 535-549.

Karlson, P. (1980)
Ecdysone in retrospect and prospect.
In: Hoffmann, J.A. (Ed.): Progress in ecdysone research. Elsevier, Amsterdam, 1-11.

Karlson, P. und Schweiger, A. (1961)
Zum Tyrosin-Stoffwechsel der Insekten.
IV. Das Phenoloxydase-System von Calliphora und seine Beeeinflussung durch das Hormon Ecdyson.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 323, 119-210.

Karlson, P. und Sekeris, C. (1962)
Zum Tyrosin-Stoffwechsel der Insekten.
IX. Kontrolle des Tyrosin-Stoffwechsels durch Ecdyson.
Biochim. biophys. Acta 63, 489-495.

Keeley, L.L. (1978)
Endocrine regulation of fat body development and function.
Ann. Rev. Entomol. 23, 329-352.

Kelly, T.J. and Telfer, W.H. (1977)
Antigenic and electrophoretic variants of vitellogenin in Oncopeltus blood and their control by juvenile hormone.
Dev. Biol. 61, 58-69.

Kemp, J.D. and Sutton, D.W. (1971)
Protein metabolism in cultured plant tissues. Calculation of an absolute rate of protein synthesis, accumulation and degradation in tobacco callus in vivo.
Biochem. 10, 81-88.

Kessler, S.W. (1975)
Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.
J. Immunol. 115, 1617-1624.

Kessler, S.W. (1981)
Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells.
In: Methods in Enzymology 73, Immunological Techniques Part B.
Academic Press, New York, 442-459 .

Kiely, M.L. and Riddiford, L.M. (1985)
Temporal patterns of protein synthesis in Manduca epidermis during the change of pupal commitment in vitro:
Their modulation by 20-hydroxy ecdysone and juvenile hormone.
Roux' Arch. Dev. Biol. 194, 336-343.

Kiguchi, K. and Riddiford, L.M. (1978)
A role of juvenile hormone in pupal developmental events during larval moulting in the silk worm, Bombyx mori.
J. Insect Physiol. 27, 805-812.

Kinnear, J.F. and Thomson, J.A. (1975)
Nature, origin and fate of major hemolymph proteins in Calliphora.
Insect Biochem. 5, 531-552.

Kipnis, D.M.; Reiss, E. and Helmreich, J. (1961)
Functional heterogeneity of the intercellular amino acid pool in mammalian cells.
Biochim. Biophys. Acta 51, 519-524.

Koolman, J. (1980)
Ecdysteroids in the blowfly, Calliphora vicina.
In: Hoffmann, J.A. (Ed.): Progress in ecdysone research.
Elsevier, Amsterdam, 187-209.

Koolman, J.; Scheller, K. and Bodenstein, D. (1979)
Ecdysteroids in the adult male blowfly Calliphora vicina.
Experientia 35, 134-135.

Kort, C.A.D. de; Bergot, B.J. and Schooley, D.A. (1982)
The nature and titre of juvenile hormone in the colorado potato beetle Leptinotarsa decemlineata.
J. Insect Physiol. 28, 471-474.

Kort, C.A.D. de and Granger, N.A. (1981)
Regulation of the juvenile hormone titer.
Ann. Rev. Entomol. 26, 1-28.

Kramer, S.J. (1978)
Age-dependent changes in corpus allatum activity in vitro in the adult Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata.
J. Insect Physiol. 24, 461-464.

Kramer, S.J. and Law, J.H. (1980)
Control of juvenile hormone production: The relationship between precursor supply and hormone synthesis in the Tobacco hornworm, Manduca sexta.
Insect Biochem. 10, 569-575.

Kramer, S.J.; Mundall, E.C. and Law, J.H. (1980)
Purification and properties of Manducin, an amino acid storage protein of the hemolymph of larval and pupal Manduca sexta.
Insect Biochem. 10, 279-288.

Kumaran, A.K. (1981)
Reprogramming in insect epidermal cells: Role of hormones.
In: Sehnal, F.; Zabza, A.; Menn, J.J. and Cymborowski,B. (Eds.): Regulation of insect development and behaviour. Vol. 2.
Wroclaw Tech. Univ. Press, Wroclaw, 451-462.

Kunkel, J.G. (1981)
A minimal modell of metamorphosis: Fat body competence to respond to juvenile hormone.
In: G. Bhaskaran, S. Friedman and J.G. Rodriguez (Eds.): Current topics in Insect Endocrinology and Nutrition. Plenum Press, New York, 107-129.

Kunkel, J.G. and Lawler, D.M. (1974)
Larval-specific protein in the order Dictyoptera.
II. Immunologic characterization in larval Blatella germanica und cross-reaction throughout the order.
Comp. Biochem. Physiol. 47B, 697-710.

Kunkel, J.G. and Nordin, J.H. (1984)
In: Gilbert, L.I. and Kerkut, G.A. (ed.):
Comprehensive insect physiology, Biochemistry and pharmacology. Vol.1, 5.
Pergamon Press, Oxford.

Kunkel, J.G. and Pan, M.L. (1976)
Selectivity of yolk protein uptake:
Comparison of vitellogenins of two insects.
J. Insect Physiol. 22, 8o9-818.

Kurtti, T.J. and Brooks, M.A. (1972)
The effect of osmotic pressure and pH on the growth of Heliothis zea cells in vitro.
In: Rodriguez, J.G. (Ed.): Insect and mite nutrition.
North-Holland Publ., Amsterdam, 387-395.

Kurtti, T.J.; Chaudhary, S.P.S. and Brooks, M.A. (1974)
Influence of physical factors on the growth of insect cells in vitro
I. Effect of osmotic pressure on growth rate of a moth cell line.
In Vitro 10, 149-156.

Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.

Laere, O.J. van (1971)
Physiology of the honeybee corpora allata.
I. Studies on queens, drones, and workers kept in natural conditions.
J. Apic. Res. 1o, 119-124.

Laere, O.J. van (1973)
Ultrastructure of the corpora alllata in the honey bee.
J. Apic. Res. 12, 99-109.

Laere, O.J. van. (1974)
Physiology of the honey bee corpora allata.
3. A new method for allatectomy of queens.
J. Apic. Res. 13, 15-18.

Lagueux, M.; Harry, P. and Hoffmann, J.A. (1981)
Ecdysteroids are bound to vitellin in newly laid eggs of Locusta.
Mol. Cell. Endocrinol. 24, 325-338.

Lagueux, M.; Hoffmann, J.A.; Goltzene, F. Kappler, C.; Tsoupras, G.; Hetru, C. and Luu, B. (1985)
Ecdysteroids in ovaries and embryos of Locusta migratoria.
(im Druck)

Lambin, P.; Rochu, D. and Fine, J.M. (1976)
A new method for determination of molecular weights of proteins electrophoresis across a sodium dodecyle sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel.
Anal. Biochem. 74, 567-575.

Lambin, P. (1978)
Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyle sulfate.
Anal. Biochem. 85, 114-125.

Lamy, M. (1984)
Vitellogenesis, vitellogenein and vitellin in the males of insects: a review.
Int. J. Invertebrate Reprod. Dev. 7, 331-321.

Landureau, J.C. (1969)
Etude des exigences d'une lignee de cellules d'insectes (souche EPa).
II. Vitamines hydrosolubles.
Exp. Cell. Res. 54, 399-402.

Lanzrein, B.; Gentinetta, V.; Fehr, R. and Lüscher, M. (1978)
Correlation between haemolymph juvenile hormone titre, corpus allatum volume, and corpus allatum in vivo and in vitro activity during oöcyte maturation in a cockroach (Nauphoeta cinerea).
Gen. Comp. Endocr. 36, 339-345.

Lanzrein. B.; Hashimoto; M.; Parmakovich, V.; Nakanishi, K.; Wilhelm, R. and Lüscher. M. (1975)
Identification and quantification of juvenile hormones from different developmental stages of the cockroach Nauphoeta cinerea.
Life Sci. 16, 1271-1284.

Laskey, R.A., and Mills, A.D. (1975)
Quantitative film detection of $^{3}H$ and $^{14}C$ in polyacrylamide gels by fluorography.
Eur. J. Biochem. 56, 335-341.

Laujervat, S. (1977)
L'evolution postimaginale du tissu adipeux femelle de Locusta migratoria et son controle endocrine.
Gen. Comp. Endocrinol. 33, 13-34.

Laurell, C.-B. (1965)
Antigen-antibody crossed electrophoresis.
Anal. Biochem. 10, 358.

Lea, A.O. (1972)
Regulation of egg maturation in the mosquito by the neurosecretory system: the role of the corpus cardiacum.
Gen. Comp. Endocr. Suppl. 3, 602-608.

Lensky, Y.; Baehr, J.-C. et Porcheron, P. (1978)
Dosages radio-immunologiques des ecdysones et des hormones juveniles au cours du developpement post embryonnaire chez le ouvrieres et les reines d'Abeille (Apis mellifica. L. var. ligustica).
C.R.Acad.Sc. Paris 287, Ser. D, 821-824.

Lensky, Y. and Skolnik, H. (1980)
Immunochemical and electrophoretical identification of the queen bee.
Comp. Biochem. Physiol. 66 B, 185-193.

Loof, A. de; Madhavan, K.; Girard, J.E.; Schneiderman, H.A. and Meinwald, J. (1976)
A novel method for the quantitative extraction of juvenile hormones from insects including the silverfish, Thermobia domestica.
J. Insect Physiol. 23, 829-832.

Loof, A. de and van de Veire M. (1972)
Time saving improvements in the Galleria bioassay for juvenile hormone.
Experientia 28, 366-367.

Lüscher, M. and Walker, I. (1963)
Zur Frage der Wirkungsweise der Königinnenpheromone bei der Honigbiene.
Rev. Suisse Zool. 70, 304-311.

Lukoschus, F. (1956)
Untersuchungen zur Entwicklung der Kastenmerkmale bei der Honigbiene (Apis mellifica L.).
Z. Morphol. Ökol. Tiere 45, 157-197.

Mackensen, O. (1947)
Effect of carbon dioxide on initial oviposition of artificially inseminated and virgin queen bees.
J. Econ. Ent. 40, 344-349.

Mancini, G.; Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. (1965)
Immunological quantitation of antigens by single radial diffusion.
Immunochem. 2, 235.

Mann, H.B. and Whitney, D.R. (1947)
On a test of whether one of two random variations is stochastically larger than the other.
Amer. Math. Statist 18, 52-54.

Marks, E.P. (1980)
Insect Tissue Culture: An overview 1971-78.
Ann. Rev. Entomol. 25, 73-101.

Marston, Campbell and Boldt (1975)
Mass producing eggs of the greater wax moth.
USDA Tech. Bull. 1510.

Mauchamp, B.; Lafont, R. and Jourdain, D. (1979)
Mass fragmentographic analysis of juvenile hormone I levels during the last larval instar of Pieris brassicae.
J. Insect Physiol. 25, 545-550.

Mazzone, H.M. (1976)
Influence of polyphenol oxidase on hemocyte cultures of the gypsy moth.
In: Kurstak, E. and Maramorosch, K.: Invertebrate Tissue Culture. Appications in Medicine, Biology and Agriculture. Academic Press 1976, 275-278.

Morgan, J.F.; Morton, H.J. and Parker, R.C. (1950)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73,1.

Morgan, E.D. and Poole, C.F. (1976)
The pattern of ecdysone levels during development in the desert locust, Schistocerca gregaria.
J. Insect Physiol. 22, 885-889

Müssbichler, A. (1952)
Die Bedeutung äußerer Einflüsse und der Corpora allata bei der Afterweiselentstehung von Apis mellifica.
Z. Vergl. Physiol. 34, 207-221.

Mundall, E.C. and Engelmann, F. (1977)
Endocrine control of vitellogenin synthesis and vitellogenesis in Triatoma protracta.
J. Insect Physiol. 23, 825-836.

Mundall, E.C. and Law, J.H. (1979)
Physical and chemical characterization of vitellogenin from the hemolymph and eggs of the tobacco hornworm, Manduca sexta.
Comp. Biochem. Physiol. 63B, 459-468.

Munn, E.A.; Feinstein, A. and Greville, G.D. (1971)
The isolation and properties of the protein calliphorin.
Biochem. J. 124, 367-374.

Murthy, M.R.V. and Leroux, T. (1975)
Determination of proteins in extracts containing interfering substances in radioactive samples following scintillation counting.
Anal. Biochem. 64, 18-29.

Natali, P.G.; Pellegrino, M.A.; Walker, L.; Ferrone, S. and Reisfeld, R.A. (1979)
zit. nach:
MacSween, J.M. and Eastwood, S.L. (1981)
Recovery of antigen from staphylococcal protein A-antibody adsorbents.
Meth. Enzymol. 73, 459-471.

Oertel, E. (1930)
Metamorphosis in the honeybee.
J. Morph. 50, 295-339.

Okada, M. and Natori, S. (1983)
Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of Sarcophaga pellegrina (flesh-fly) larvae.
Biochem. J. 211, 727-734.

Ono, S.E.: Nagayama, H. and Shimura, K. (1975)
The occurrence and synthesis of female- and egg-specific proteins in the silkworm, Bombyx mori.
Insect Biochem. 5, 313-329.

Pan, M.L. (1971)
The synthesis of vitellogenin in the cecropia silkworm.
J. Insect Physiol. 17, 677-689.

Pan, M.L. (1977)
Juvenile hormone and vitellogenin synthesis in the cecropia silkworm.
Biol. Bull. 153, 336-345.

Pan, M.L.; Bell, W.J. and Telfer, W.H. (1969)
Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body.
Science 165, 393-394.

Pappas, C. and Fraenkel, G. (1978)
Hormonal aspects of oogenesis in the flies Phormia regina and Sarcophaga bullata.
J. Insect Physiol. 24, 75-80.

Paulino, Z. (1977)
Relatorio Semestral de Pesquisa, Univ. Sao Paulo

Paulino Simoes, Z. (1984)
Haploid and diploid honeybee drones are JH sensitive: female specific proteins in fat body and hemolymph.
Adv. Invertebrate Reprod. 3, 622.

Pflugfelder, O. (1948)
Volumetrische Untersuchungen an den Corpora allata der Honigbiene, Apis mellifica L.
Biol. Zbl. 67, 223-241.

Philippe, C. (1982)
Culture of fat body of Periplaneta americana: Tissue development and establishment of cell lines.
J. Insect Physiol. 28, 257-265.

Plantevin, G.; de Reggi, M. and Nardon, C. (1984)
Changes in ecdysteroid and juvenile hormone titers in the hemolymph of Galleria mellonella larvae and pupae.
Gen. Comp. Endocrinol. 56, 218-230.

Postlethwait, J.H. and Kaschnitz, R. (1978)
The synthesis of Drosophila melanogaster vitellogenins in vivo, in culture and in a cell-free translation system.
FEBS Lett. 95, 247-251.

Pratt, G.E. and Davey, K.G. (1972)
The corpus allatum and oogenesis in Rhodnius prolixus.
J. Exp. Biol. 56, 201-214.

Pratt, G.E. and Tobe, S.S. (1974)
Juvenile hormones biosynthesized by corpora allata of adult female locusts in vitro.
Life Sci. 14, 575-586.

Pratt, G.E.; Tobe, S.S.; Weaver, R.J. and Finney, J.R. (1975)
Spontaneous synthesis and release of $C_{16}$-juvenile hormone by isolated corpora allata of female locust Schistocerca gregaria and female cockroach Periplaneta americana.
Gen. Comp. Endocr. 26, 478-484.

Racioppi, J.V.; Hagedorn, H.H. and Calvo, J.M. (1984)
Physiological mechanisms controlling the reproductive cycle of the mosquito Aedes aegypti.
In: Engels, W. et al. (ed.):
Advances in invertebrate Reproduction. Vol. 3.
Elsevier, Amsterdam. New York, Oxford, 259-265.

RAL (1976)
Übersichtskarte RAL-F2 zum Farbregister RAL 840 HR.
RAL, Ausschuß für Lieferbedingungen und Gütesicherung (ed.), Muster-Schmidt KG, Göttingen.

Ramamurty, P.S. and Engels, W. (1977)
Allatectomy and juvenile hormone effects on synthesis and incorporation of vitellogenin in the honeybee queen (Apis mellifica).
Zool. Jb. Physiol. 81, 165-176.

Regel, R. (1978)
Auswirkungen einer Langzeitbehandlung mit unterschiedlichen Dosen von Juvenilhormon III auf Verhalten und Fertilität von Jungköniginnen.
Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 1, 313-316.

Rehm, P. (1951)
Die zeitliche Folge der Tätigkeitsrhythmen inkretorischer Organe von Ephestia kühniella während der Metamorphose und des Imaginallebens.
Roux' Arch. Entw. Mech. Organ. 145.

Rembold, H. (1984)
What means zero juvenile hormone concentration in absolute physiological terms?
XVII. Int. Congr. Entomol., Hamburg, 258.

Rembold, H.; Czoppelt, C. and Sharma, G.K. (1979)
Precocene II is no anti-juvenile hormone in the honey bee, Apis mellifera.
Z. Naturforsch. 34c, 1261-1263.

Rembold, H. and Hagenguth, H. (1981)
Modulation of hormone pools during postembryonic development of the female honey bee castes.
In: Sehnal, F; Zabza, A.; Menn, J.J. and Cymborowski, B. (Eds.): Regulation of insect development and behavior. Vol. 2.
Wroclaw Tech. Univ. Press, Wroclaw, 427-440.

Rembold, H.; Kremer, J.-P. and Ulrich, G.M. (1980)
Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, Apis mellifera L.
Apidologie 11, 29-38.

Reum, L. and Koolmann, J. (1979)
Analysis of ecdysteroids by radioimmunoassay: Comparison of three different antisera.
Insect Biochem. 9, 135-142.

Rhein, W.v. (1933)
Über die Entstehung des weiblichen Dimorphismus im Bienenstaate.
Roux' Arch. Entw. Mech. Organ. 129, 601-655.

Riddiford, L.M. (1980)
Action of hormones at the cellular level.
Ann. Rev. Physiol. 42, 511-528.

Riddiford, L.M. (1981)
Hormonal control of epidermal cell development.
Amer. Zool. 21, 751-762.

Riddiford, L.M.; Curtis, A.T. and Kiguchi, K. (1979)
Culture of the epidermis of the tobacco hornworm Manduca sexta.
TCA Manual 5, 975-985.

Riddiford, L.M. and Law, J.H. (1983)
Larval serum proteins of Lepidoptera.
In: Scheller, K. (Ed.): The larval serum proteins of insects.
Thieme, Stuttgart, 75-85.

Robertson, J.H. and Wheatley, D.N. (1979)
Pools and protein-synthesis in mammalian cells.
Biochem. J. 178, 699-709.

Robinson, J.H. (1977)
Nature of aminoacid pool used for protein synthesis in cultured, androgen responsive tumor cells.
Exp. Cell. Res. 106, 239-243.

Röseler, P.-F. (1974)
Vergleichende Untersuchungen zur Oogenese bei weiselrichtigen und weisellosen Arbeiterinnen der Hummelart Bombus terrestris L.
Insectes sociaux 21, 249-274.

Röseler, P.-F. (1977)
Juvenile hormone control of oogenesis in bumblebee workers Bombus terrestris.
J. Insect Physiol. 23, 985-992.

Röseler, P.-F. (1985)
Endocrine basis of dominance and reproduction in polistine paper wasps. In: Hölldobler, F. und Lindauer, M. (Hrsg.): Fortschritte der Zoologie 31: Experimental Behavioural Ecology. G. Fischer, Stuttgart; 259-272.

Röseler, P.-F. and Röseler, I. (1978)
Studies on the regulation of the juvenile hormone titre in bumblebee workers, Bombus terrestris.
J. Insect Physiol. 24, 7o7-713.

Röseler, P.-F. and Röseler, I. (1984)
Der Einfluß von $CO_2$ und der Kauterisation der Pars intercerebralis auf die Aktivität der Corpora allata und die Eibildung bei Hummeln (Bombus hypnorum und Bombus terrestris)
Zool. Jb. Physiol. 88, 237-246.

Röseler, P.-F.; Röseler, I. and van Honk, C.G.J. (1981)
Evidence for inhibition of corpora allata activity in workers of Bombus terrestris by a pheromone from the queens mandibular glands.
Experientia 37, 348-352.

Röseler, P.-F-; Röseler, I.; Strambi, A. and Augier, R. (1984)
Influence of insect hormones on the establishment of dominance hierarchies among foundresses of the paper wasp, Polistes gallicus.
Behav. Ecol. Sociobiol. 15, 133-142.

Rogers, A.W. and Moran, J.F. (1966)
Anal. Biochem. 16, 206-

Romer, F.; Emmerich, H. and Nowock, J. (1974)
Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of Tenebrio molitor in vitro.
J. Insect Physiol. 20, 1975-1987.

Roth, L.M. (1973)
Inhibition of oöcyte development during pregnancy in Eublaberus posticus.
J. Insect Physiol. 19, 455-469.

Rowley, A.F.; Ratcliffe, N.A. and Leonard, C.M. (1984)
Role of agglutinins and components of the phenoloxidase system in the recognition of foreignness by insect hemocytes.
XVII. Int. Congr. Entomol. Hamburg, 760.

Ruttner, F. und Hesse, B. (1981)
Rassenspezifische Unterschiede in Ovarentwicklung und Eiablage von weisellosen Arbeiterinnen der Honigbiene Apis mellifera L.
Apidologie 12, 159-183.

Rutz, W.; Gerig, L.; Wille, H. and Lüscher, M. (1976)
The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, Apis mellifera
J. Insect Physiol. 22, 1485-1491.

Rutz, W. and Lüscher, M. (1974)
The occurence of vitellogenin in workers and queens of Apis mellifica and the possibility of its transmission to the queen.
J. Insect Physiol. 20, 897-909.

Ryan, R.O.; Schmidt, J.O. and Law, J.H. (1984)
Arylphorin from the haemolymph of the larval honeybee, Apis mellifera.
Insect Biochem. 14, 515-520.

Sanborn, R.C. and Haskell, J.A. (1961)
Proc. XI. Int. Congr. Entomol. Vol. B3, 237-243.

Schabacker, H. (1973)
Hämolymphproteine und Oogenese-Aktivität der 4 rezenten Honigbienen-Arten der Gattung Apis.
Staatsexamenarbeit, Münster.

Schooley, D.A. (1977)
Analysis of the naturally occurring juvenile hormones - their isolation, identification and titer determination at physiogical levels.
In: Turner, R.B. (ed.): Analytical biochemistry of Insects.
Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York; 241-287.

Schooneveld, H. (1979)
Precocene induced necrosis and haemocyte-mediated breakdown of corpora allata in nymphs of the locust, Locusta migratoria.
Cell. Tiss. Res. 203, 25-33.

Schwinck, I. (1951)
Veränderungen der Epidermis der Perikardialzellen und der Corpora allata in der Larvalentwicklung von Panorpa communis L. unter normalen und experimentellen Bedingungen.
Roux' Arch. 145.

Shapiro, A.L.; Vinuela, E. and Maizel, J.V. (1967)
Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-Polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820.

Sidie, J.M. (1977)
Chemical changes in hemolymph of foraging honeybees as a result of flight.
Amer. Zool. 17, 918.

Sidie, J.M. (1978)
Foraging honeybee hemolymph analysis.
Amer. Zool. 18, 589.

Sohi, S.S. (1980)
The effect of pH and osmotic pressure on the growth and survival of three lepidopteran cell lines.
In: Kurstak, Maramorosch,Dübendorfer (Eds.): Invertebrate systems in vitro. Elsevier, Amsterdam, 35-43.

Spindler, K.-D.; Beckers, C.; Groeschel-Stewart, U. and Emmerich, H. (1978)
A radioimmunoassay for arthropod moulting hormones, introducing a novel method of immunogen coupling.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1269-1275.

Stanley, M. (1968)
Initial results of honeybee tissue culture.
Bull. Apic. 11, 45-55.

Stay, B.; Friedel, T.; Tobe, S.S. and Mundall, E.C. (1980)
Feedback control of juvenile hormone synthesis in cockroaches: Possible role for ecdysterone.
Science 207, 898-900.

Stevenson, E. and Wyatt, G.R. (1962)
The metabolism of silkmoth tissues.
I. Incorporation of leucine into protein.
Arch. Biochem. Biophys. 99, 65-71 (1962)

Strambi, A.; Strambi, C. and Reggi, M.L. de (1977)
Ecdysones and ovarian physiology in the adult paper wasp Polistes gallicus.
Proc. VIII. Int. Congr. IUSSI, Wageningen, 19-20.

Suzuki, A. and Ishizaki, H. (1984)
Neurohormones in silkworm, Bombyx mori.
XVII. Int. Congr. Entomol., Hamburg, 264.

Takahashi, H.; Komano, H.; Kawaguchi, N.; Obinata, M. and Natori, S. (1984)
Activation of the secretion of specific proteins from fat body following injury to the body wall of Sarcophaga peregrina larvae.
Insect Biochem. 14, 713-717.

Tata, J.R. (1976)
The expression of the vitellogenin gene.
Cell 9, 1-14.

Telfer, W.H. (1954)
Immunological studies of insect metamorphosis.
II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the Cecropia silkworm.
J. Gen. Physiol. 37: 539-558.

Telfer, W.H. (1960)
The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths.
Biol. Bull. 118, 338-351.

Telfer, W.H. and Anderson, L.M. (1968)
Functional transformation accompanying the initiation of a terminal growth phase in the cecropia moth oocyte.
Dev. Biol. 17, 512-535.

Telfer, W.H.; Keim. P.S. and Law, J.H. (1983)
Arylphorin, a new protein from Hyalophora cecropia: Comparisons with calliphorin and manducin.
Insect Biochem. 13, 601-613.

Thompson, P.R. (1978)
Histological development of cuticle in the worker honeybee, Apis mellifica adansonii.
J. Apic. Res. 17, 32-40.

Thomson, J.A. (1975)
Major patterns of gene activity during development in holometabolous insects.
Adv. Insect Physiol. 12, 321-398.

Tobe, S.S. (1980)
Regulation of the corpora allata in adult female insects.
In: Locke, M. and Smith, D.S. (Eds.): Insect biology in the future.
Academic Press, New York, 345-367.

Tobe, S.S. and Pratt, G.E. (1974)
The influence of substrate concentrations on the rate of insect juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of the desert locust in vitro.
Biochem. J. 144, 107-113.

Tobe, S.S. and Pratt, G.E. (1975)
Corpus allatum activity in vitro during ovarian maturation in the desert locust, Schistocerca gregaria.
J. Exp. Biol. 62, 611-627.

Tobe, S.S. and Stay, B. (1977)
Corpus allatum activity in vitro during the reproductive cycle of the viviparous cockroach, Diploptera punctata.
Gen. Comp. Endocr. 31, 138-147.

Tobe, S.S.; Stay, B.; Friedel, T., Feyereisen, R. and Paulson, C. (1981)
The role of the brain in regulation of the CA in female Diploptera punctata.
In: Pratt, G.E. and Brooks, G.T. (Eds.): Juvenile hormone biochemistry.
Elsevier, Amsterdam, 161-174.

Trautman, K.H.; Masner, P.; Schuler, A.; Suchy, M. and Wipf, H.-K. (1974)
Evidence of the juvenile hormone methyl (2E, 6E)-10,11,-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate (JH III) in insects of four orders.
Z. Naturforsch. 29c, 757-759.

Trenczek, T. (1984)
Vitellogenin-Vorkommen bei Drohnen der Honigbiene.
Inaugural-Dissertation, Tübingen.

Truman. J.W. (1976)
Development and hormonal release of adult behaviour patterns in silkmoths.
J. Comp. Physiol. 107, 39-48.

Truman, J.W. (1978)
Hormonal release of stereotyped motor programmes from the isolated nervous system of the cecropia silkmoth.
J. Exp. Biol. 74, 151-173.

Truman, J.W. (1981)
Interaction between ecdysteroid, eclosion hormone and bursicon in Manduca sexta.
Amer. Zool. 21, 655-661.

Truman, J.W.; Taghert, P.H.; Copenhaver, P.F.; Tublitz, N.J. and Schwartz,L.M. (1981)
Eclosion hormone may controll all ecdyses in insects.
Nature 291, 70-71.

Unnithan, G.C.; Nair, K.K. and Bowers, W.S. (1977)
Precocene induced degeneration of the corpus allatum of adult females of the bug, Oncopeltus fasciatus.
J. Insect Physiol. 23, 1081-1094.

Varjas, L.; Paguia, P. and de Wilde, J. (1976)
Juvenile hormone titers in penultimate and last instar larvae of Pieris Brassicae and Barathrae brassicae in relation to the effect of juvenoid application.
Experientia 32, 249-251.

Vaughn, J.L. (1971)
Culture media and methods.
In: Vago, C.(ed): Intervertebrate tissue culture, Vol 1. Academic Press, New York. 3-40.

Vaughn, J.L. (1973)
Sample preparations of media.
In: Kruse, P.F. and Patterson, M.K. (eds.): Tissue culture, Methods and Applications., Academic Press, New York and London, 692-697.

Vaughn, J.L. and Goodwin, R..H. (1976)
Preparation of several media for the culture of tissue and cells from intervertebrates.
TCA Manual 3, 527-538.

Velthius, H.H.W. (1976)
Egg-laying, aggression ande dominance in bees.
Proc. XV. Int. Congr. Entomol., Washington, 436-449.

Velthius, H.H.W. (1985)
The honeybee queen and the social organisation of her colony.
In: Hölldobler, F. und Lindauer, M. (Hrsg.): Fortschritte der Zoologie 31: Experimental Behavioural Ecology. G. Fischer, Stuttgart. 343-357.

Verma, L.R. (1973)
Osmotic analysis of honey bee semen and hemolymph.
Am. Bee J. 113, 412.

Wachter, R. de, and Fiers, W. (1967)
Anal.Biochem. 18, 351.

Wallace, R.A. and Jared, D.W. (1968)
Estrogen induces lipophosphoprotein in serum of male Xenopus laevis.
Science 16o, 91-92.

Wang. D.I. (1965)
Growth rates of young queen and worker honey bee larvae.
J. Apis. Res. 4, 3-5.

Wang, D.I. and Moeller, F.E. (1970)
Comparison of the free amino acid composition in the hemolymph of healthy and Nosema infected female honey bees.
J. Invertebrate Pathol. 15, 202-206.

Wang, L.J. and Knowland, J. (1975)
Synthesis of vitellogenin in cultures of male and female frog liver regulated by estradiol treatment in vitro.
PNAS USA 72, 3172-3175.

Weaver, R.J.; Pratt, G.E. and Finney, J.R. (1975)
Cyclic activity of the corpus allatum related to gonadotrophic cycles in the adult female Periplaneta americana.
Experientia 31, 597-598.

Weaver, R.J.; Pratt, G.E.; Hamnett, A.F. and Jennings, R.C. (1980)
The influence of incubation conditions on the rates of juvenile hormone biosynthesis by corpora allata isolated from adult females of the beetle Tenebrio molitor.
Insect Biochem. 10, 245-254.

Weiss, K. (1974)
Zur Frage des Königinnengewichtes in Abhängigkeit von Umlarvalter und Larvenversorgung.
Apidologie 5, 127-147.

Wheatley, D.N. (1982)
On the problem of linear incorporation of amino acids into cell protein.
Experientia 38, 818-820.

Wheatley, D.N. and Walker, E. (1980)
Comparison of amino acid uptake and incorporation in Tetrahymena pyriformis and Hela-cells.
J. Comp. Physiol. B 140, 267-274 (1980).

Wigglesworth, V.B. (1936)
The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of Rhodnius prolixus.
Quart. J. Microsc. Sci. 77, 191-222.

Wigglesworth, V.B. (1943)
The fate of haemoglobin in Rhodnius prolixus (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods.
Proc. Roy. Soc. London B 131, 313-339.

Wigglesworth, V.B. (1973)
The significance of "apolysis" in the moulting of insects.
J. Entomol. (A) 47, 141-149.

Wilde, J. de (1984)
Extrinsic control of physiological processes mediated by the neuroendocrine system.
In: Borkovec, A.B. and Kelly, T.J. (Ed.): Insect Neurochemistry and Neurophysiology. Plenum Press, 151-169.

de Wilde, J.; Staal, G.B.; de Kort, C.A.D.; de Loof, A. and Baard, G. (1968)
Juvenile hormone titer in the haemolymph as a function of photoperiodic treatment in the adult Colorado beetle (Leptinotarsa decemlineata Say).
Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. 71, 321-326.

Wilhelm, R. and Lüscher, M. (1974)
On the relative importance of juvenile hormone and vitellogenin for oöcyte growth in the cockroach Nauphoeta cinerea.
J. Insect Ohysiol. 20, 1887-1894.

Wilkens, J.L. (1969)
The endocrine control of protein metabolism as related to reproduction in the fleshfly Sarcophaga bullata.
J. Insect Physiol. 15, 1015-1024.

Willis, J.H. (1981)
Juvenile hormone: The status of "status quo".
Amer. Zool. 21, 763-773.

Wolbert, P. (1984)
Juvenilhormon-Sensibilität und Ecdysteroidtiter während der imaginalen Determination der Epidermiszellen in der Puppe von Galleria.
Zool. Jb. Physiol. 88, 225-236.

Wyatt, G.R. (1967)
The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects.
Adv. Insect Physiol. 4, 281-354 (1967)

Wyatt, G.R. (1968)
Metamorphosis: A problem in developmental biology.
Biochemistry of insect metamorphosis, 143-184.

Wyatt, G.R. (1975)
Regulation of protein and carbohydrate metabolism in insect fat body.
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1974, 209-226.

Wyatt, G.R. (1980)
The fat body as a protein factory.
In: Locke, M. and Smith, D.S. (eds): Insect Biology in the Future.
Academic Press, New York, 201-225.

Wyatt, G.R.; Chen, T.T. and Couble, P. (1976)
Juvenile-hormone induced vitellogenin synthesis in locust fat body in vitro.
In: Kurstak, E. and Maramorosch, K. (eds): Intervertebrate tissue culture.
Applications in medicine, biology and agriculture. Academic Press,N.Y.
195-202.

Wyatt, G.R.; Locke, J. and Bradfield, J.Y. (1984)
The vitellogenin genes of locusta migratoria and other insects.
In: Engels, W. et al. (Eds.): Adv. Invertebrate Reprod. Vol 3., 73-80.

Wyatt, G.R. and Pan, M.L. (1978)
Insect plasma proteins.
Ann. Rev. Biochem. 47, 779-817.

Wyatt, G.R. and Wyatt, S.S. (1976)
The development of an insect tissue culture medium.
In: Kurstak, E. and Maramorosch, K. (Ed.): Invertebrate tissue culture.
Applications in Medicine, Biology and Agriculure.
Academic Press, New York, 249-255.

Wyatt, S.S. (1956)
Culture of tissue from the silkworm Bombyx mori (L.).
J. Gen. Physiol. 39, 841-853.

Zander, E.; Löschel, F. und Meier, K. (1916)
Die Ausbildung des Geschlechtes bei der Honigbiene (Apis mellifica L.).
Z. angew. Ent. 3, 1-74.

Zillikens, A. (1984)
Vitellogenin-Syntheseraten bei imaginalen Bienendrohnen:
Abhängigkeit von Alter und Juvenilhormon.
Diplomarbeit, Tübingen

Meine akademischen Lehrer in Biologie waren:

**Christian-Albrechts-Universität Kiel**

H. Bohlken, H.-J. Brandt, H. Brodowsky, W. Herre, B. Heydemann, P. Hirsch, R. Kollmann, Krebs, Kullmann, Lincke, Mondon, K. Müller, H. Müller-Buschbaum, W. Noodt, W. Preetz, W. Raabe, J. Richter, W .Schultz, V. Storch, H. Straka, W. Tischler, U. Welsch.

**Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

K. Altendorf, D. Ammermann, W. Bessler, V. Braun, K. Drumm, W. Engels, H. Erkert, U. Feine, K.G. Grell, J. Guglielmi, K.P. Hadeler, A. Hager, W. Harder, V. Hemleben, E. Kallee, O. Klee, H.J. Lipps, W. Loeffler, R.J. Lorenz, G.F. Meyer, G. Mickoleit, F.-P. Möhres, H. Netzel, F. Oberwinkler, K. Pelling, H. Probst, H.J. Reinecke, B. Schwemmle, W. Seyffert, D. Sperlich, G. Weitzel, K. Wöhrmann, G. Wolf, H.Zähner.

## Lebenslauf

---

Hans-Hinrich Kaatz
geboren am 26.12.1952 in Hamburg

Eltern: Annemarie Kaatz, geb. Jonas
Gerhard Kaatz

### Schulausbildung

| | |
|---|---|
| 1959-1962 | Grundschule Dockenhuden, Hamburg |
| 1962-1971 | Gymnasium f.J. u. M. Blankenese, Hamburg |

### Studium

| | |
|---|---|
| SS 1972 | Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel |
| SS 1974 | Zwischenprüfung in Biologie, Chemie und Physik |
| WS 1974/75 | Hauptstudium der Biologie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| SS 1978-80 | Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. W. Engels am Institut f. Biologie III. Lehrstuhl Entwicklungsphysiologie |
| August 1980-April 1981 | Forschungsaufenthalt in den USA als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) bei Prof. Dr. H.H. Hagedorn, Dept. of Entomology, Cornell University, Ithaca, N.Y. und Prof. Dr. N.E. Gary, Dept. of Entomology, Div. of Apiculture, University of California, Davis. |
| Seit 1981 | Doktorand am Institut f. Biologie III, Lehrstuhl Entwicklungsphysiologie der Universität Tübingen (Leitung Prof. Dr. W. Engels). |